

Université de Montréal

**Étude de la migration des populations de lymphocytes B du sang de patients infectés
par le virus d'immunodéficience humaine (VIH)**

Par

Julie Gauvin

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en microbiologie et immunologie

Novembre 2015

© Julie Gauvin, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Étude de la migration des populations de lymphocytes B du sang de patients infectés
par le virus d'immunodéficience humaine (VIH)**

Par

Julie Gauvin

a été évalué par le jury suivant :

Dre Carolina Alfieri, président-rapporteur

Dr Michel Roger, directeur de recherche

Dre Johanne Poudrier, co-directrice de recherche

Dre Sylvie Lesage, membre du jury

RÉSUMÉ

La dérégulation du compartiment de cellules B est une conséquence importante de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). On observe notamment une diminution des nombres de lymphocytes B sanguins ainsi qu'une variation des fréquences relatives des différentes populations de lymphocytes B chez les individus infectés par rapport aux contrôles sains. Notre laboratoire a précédemment démontré l'implication des cellules dendritiques dans la dérégulation des lymphocytes B via la production excessive de BLyS/BAFF, un stimulateur des cellules B. De plus, lors d'études menées chez la souris transgénique présentant une maladie semblable au SIDA, et chez la souris BLyS/BAFF transgénique, l'infection au VIH-1 fut associée à une expansion de la zone marginale (MZ) de la rate. De façon intéressante, nous observons chez les contrôleurs élites une diminution de la population B 'mature' de la MZ. Il s'agit du seul changement important chez les contrôleurs élites et reflète possiblement un recrutement de ces cellules vers la périphérie ainsi qu'une implication dans des mécanismes de contrôle de l'infection. Pour tenter d'expliquer et de mieux comprendre ces variations dans les fréquences des populations B, nous avons analysé les axes chimiotactiques CXCL13-CXCR5, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL20-CCR6 et CCL25-CCR9.

L'étude longitudinale de cohortes de patients avec différents types de progression clinique ou de contrôle de l'infection démontre une modulation des niveaux plasmatiques de la majorité des chimiokines analysées chez les progresseurs rapides et classiques. Au contraire, les contrôleurs élites conservent des niveaux normaux de chimiokines, démontrant leur capacité à maintenir l'homéostasie. La migration des populations de cellules B semble être modulée selon la progression ou le contrôle de l'infection. Les contrôleurs élites présentent une diminution de la population B 'mature' de la MZ et une augmentation de la fréquence d'expression du récepteur CXCR7 associé à la MZ chez la souris, suggérant un rôle important des cellules de la MZ dans le contrôle de l'infection au VIH-1. De façon générale, les résultats dans cette étude viennent enrichir nos connaissances du compartiment de cellules B dans le

contexte de l'infection au VIH-1 et pourront contribuer à élaborer des stratégies préventives et thérapeutiques contre ce virus.

Mots clés : Lymphocytes B, Virus de l'immunodéficience humaine (VIH), chimiotactisme, chimiokines, migration, progression clinique, zone marginale, populations de cellules B, analyse longitudinale

ABSTRACT

Deregulation of the B-cell compartment is an important consequence of human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. We observe a decrease in blood B lymphocyte numbers accompanied by variations in the relative frequency of B cell populations in infected individuals when compared to healthy controls. Our lab has previously exposed the implication of dendritic cells in B-cell deregulation via excessive production of B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). Additionally, the study of BLyS/BAFF-transgenic mice as well as mice exhibiting an AIDS-like disease revealed an expansion of the marginal zone (MZ) of the spleen. Interestingly, we found reduced relative frequencies of mature MZ-like B cells in the blood of elite controllers while rapid and classic HIV progressors had increased ‘precursor’ MZ-like cells. This variation in elite controllers is the only one observed for all population analyzed and could be the reflection of active recruitment of these cells to the periphery to help control infection.

To try and understand these variations in B-cell frequencies we have analyzed the B-tropic chemotaxis axes CXCL13-CXCR5, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL20-CCR6 and CCL24-CCR9. The longitudinal study of patients with varying degrees of disease progression and control shows a modulation of the levels of most chemokines in the blood of rapid and classic progressors. Meanwhile, elite controllers maintain normal levels of these chemokines, demonstrating their ability to preserve homeostasis. Our results suggest that the type of disease progression impacts B-cell migration, resulting in modified B-cell population frequencies.

The decrease in mature MZ-like B-cells and the increased frequency of cells expressing CXCR7, a receptor associated to the MZ in mice, in elite controllers suggest an important role for the MZ in controlling HIV-1 infection. Overall, our results provide more information about the B-cell compartment in the context of HIV-1 infection and can contribute to the elaboration of preventive and therapeutic strategies for HIV-1.

Key words: B lymphocytes, Human immunodeficiency virus (HIV), chemotaxis, chemokine, migration, clinical progression, marginal zone, B cell populations, longitudinal analysis.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Listes des abréviations	x
Dédicace.....	xii
Remerciements.....	xiii
Revue de littérature	1
1. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	1
1.1. Découverte.....	1
1.2. Origine	1
1.3. Structure du virus.....	2
1.4. Génome viral	2
1.5. Cycle de réplication	3
1.5.1.Phase précoce : Adsorption, fusion, décapsidation, transcription inverse, intégration	3
1.5.2.Phase tardive : transcription, épissage, traduction, assemblage, bourgeonnement.	4
1.6. Cellules cibles du VIH-1	5
2. Lymphocytes B.....	7
2.1. Origine et différenciation	7
2.2. Maturation dans la rate et décision du type cellulaire	8
2.3. Activation des lymphocytes B	9
3. Pathogénèse du VIH et SIDA	11

3.1. Transmission.....	11
3.2. Phases de l'infection	12
3.2.1. Phase aiguë.....	13
3.2.2. Phase chronique	14
3.2.3. Phase SIDA	14
3.2.4. Réservoirs.....	14
3.3. Types de progression clinique	15
3.3.1. Rapides.....	15
3.3.2. Classiques.....	16
3.3.3. Progresseurs lents	16
3.4. Traitements	16
3.5. Impacts de la pathogénèse chez l'hôte.....	18
3.5.1. Dérégulation du système immunitaire	18
3.5.2. Translocation microbienne.....	19
3.5.3. Dérégulation des cellules dendritiques.....	19
3.6. Dérégulation du compartiment de lymphocytes B	21
3.6.1. Effets de ART sur le compartiment B.....	24
3.6.2. Production de BLyS/BAFF par les DCs et contribution à la dérégulation du compartiment de lymphocytes B.....	24
4. Chimioquinas et récepteurs.....	25
4.1. Types de chimiokines	26
4.1.1. Homéostatiques	26
4.1.2. Inflammatoires	26
4.2. Récepteurs à chimiokines	27
4.3. Mécanisme.....	27
4.4. Chimioquinas et lymphocytes B.....	29
4.5. Les chimiokines et récepteurs sélectionnés pour cette étude.....	29
4.5.1. CXCL13 (BCA-1) – CXCR5.....	29
4.5.2. CXCL12 (SDF-1) – CXCR4/CXCR7	30
4.5.2.1. CXCR7 récepteur atypique	31
4.5.3. CCL20 (MIP3- α) – CCR6.....	32

4.5.4. CCL25 (TECK) – CCR9	33
5. Contexte du projet	34
5.1. Études chez la souris transgénique	34
5.2. Études sur les cohortes humaines	35
5.3. Les populations de lymphocytes B étudiées.....	36
5.3.1. Transitionnelle immatures.....	36
5.3.2. Mémoires.....	36
5.3.3. Matures activées.....	37
5.3.4. De la zone marginale.....	37
Hypothèse	39
Objectif	40
Article	41
Discussion	75
Modulation des axes chimiotactiques B-tropiques – étude <i>ex vivo</i>	76
Étude de migration <i>in vitro</i>	81
Conclusion	83
Perspectives.....	84
Bibliographie.....	85
Annexes.....	xiv
Annexe 1 - Expression des récepteurs par chaque population B sélectionnée	xiv
Annexe 2 – Article, 2 ^e auteur: <i>HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans</i> (2015) JID	xv
Annexe 3 – Affiche : Journée des étudiants du Réseau SIDA/Maladies infectieuses du Fond de Recherche du Québec – Santé (FRQS) 2014.....	lvii

Annexe 4 – Affiche : 3e Journée de la recherche du Département de Microbiologie,
Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal 2014lix

Annexe 5 – Affiche : 16^e Congrès des étudiants Centre de Recherche du Centre
Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) 2013lx

LISTE DES TABLEAUX

Article :

Tableau 1: Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-infected individuals .. 62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de réplication du VIH et action des antiviraux	3
Figure 2 : Progression de l'infection au VIH	12
Figure 3 : Mécanisme d'activation par les récepteurs couplés à la protéine G	28

Article:

Figure 1: Longitudinal analysis of plasma CXCL13 levels and CXCR5 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals.....	68
Figure 2: Longitudinal analysis of plasma CXCL12 levels and CXCR4 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals.....	69
Figure 3: Longitudinal analysis of plasma CXCL11 levels and CXCR7 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals.....	70
Figure 4: Longitudinal analysis of plasma CCL20 levels and CCR6 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals.....	71
Figure 5: Longitudinal analysis of plasma CCL25 levels and CCR9 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals.....	72
Figure 6: In vitro migration of B-cell populations towards CXCL13, CXCL12, CCL20 and CCL25	73
Figure supplémentaire 1: Longitudinal variations of blood CD4 ⁺ T-cell counts and viral loads in HIV-1 infected individuals	73
Figure supplémentaire 2: Longitudinal analysis of blood B-cell populations of HIV-1 infected individuals.....	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AICDA : *Activation-induced cytidine deaminase*
APC : *Antigen-presenting cell* – Cellule présentatrice d’antigènes
APOBEC : *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ART : *Antiretroviral therapy*
BAFF : *B-cell activating factor*
BCA-1 : *B-cell attracting chemokine-1*
BCR : *B-cell receptor*
BLyS/BAFF : *B Lymphocyte Stimulator*
Bregs : Cellules B régulatrices
BTS2 : *Bone marrow stromal-cell antigen 2*
CD : *Cluster of differentiation*
CLP : *Common lymphoid precursor* – précurseur lymphoïde commun
CMH-I : Complexe d’histocompatibilité de classe I
DC : *Dendritic cell* - cellule dendritique
DC-SIGN : *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*
DL-1 : *Delta-like 1*
EBV : *Epstein-Barr Virus*
EC : Elite controllers
FCRL4 : *Fc-receptor-like-4*
GC : *Germinal center* – centre germinatif
GDP : Guanosine diphosphate
GI : Gastro-intestinal
GP : glycoprotéine
GTP : Guanosine-5'-triphosphate
HAART : *Highly active antiretroviral therapy*
HIV : *Human immunodeficiency virus*
HTLV : *Human T-cell Leukemia virus*
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ITAC : *Interferon-inducible T-cell α chemoattractant*
JAK : *Janus kinase*
LBP : *Lipopolysaccharide binding protein*
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphotoxine
LTNP : *Long term non-progressors*
MALT : *Mucosal associated lymphoid tissue* - tissus lymphoïdes associés aux muqueuses
mDC : *Myeloid dendritic cell* – cellule dendritique myéloïde
MIP3- α : *Macrophage inflammatory protein 3- α*

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*
MZ : *Marginal zone – zone marginale*
NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
Nef : *Negative factor*
NIH : *National Institutes of Health*
NK : *Natural killer cell – Cellule tueuse naturelle*
ONU : *Organisation des Nations Unies*
PBMC : *Peripheral blood mononuclear cells*
pDC : *Plasmacytoid dendritic cell – cellule dendritique plasmacytoïde*
PI : *Post-infection*
PI3K : *Phosphoinositide-3 kinase*
SCY : *Small secreted cytokine*
SIDA : *Syndrôme de l'immunodéficience acquise*
SNC : *Système nerveux central*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
TACI : *Trans-membrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor*
TECK : *Thymus expressed chemokine*
Tfh : *T follicular helper – cellule T folliculaire auxiliaire*
Th : *Helper T cell – Lymphocyte T auxiliaire*
TI : *T-indépendante (activation)*
TI : *Transitionnelles immatures (cellules B)*
TLR : *Toll-like Receptor*
Treg : *Cellule T régulatrice*
Vif : *Viral infectivity factor*
VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*
VIS : *Virus de l'immunodéficience simienne*
Vpr : *Viral protein R*
Vpu : *Viral protein U*

Pour Lise et François, merci de votre support

REMERCIEMENTS

Un tel projet ne se réalise pas sans l'appui de plusieurs personnes. Merci à Michel Roger de m'avoir prise dans cette équipe chaleureuse, on n'est jamais trop de filles! Toute ma reconnaissance à Josiane, sans qui je serais encore en train de lire des manuels d'instruction. Ta patience et ton aide continuelle m'ont été si précieuses, je serai toujours convaincue que tu as une réponse à tout! Merci à Johanne de partager ta passion avec nous. Ton support inébranlable et la richesse de tes connaissances ont permis la réalisation de ce projet, merci pour tes encouragements.

À mes collègues de laboratoire, Catherine, Valérie, Josiane, Laurie-Anne, Karine et Marie-Claude j'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés. Je vous souhaite tout le succès que vous méritez. Merci pour les beaux moments. Un merci spécial aux filles du labo Lapointe, les superhéros du FACS!

Merci à mes amis Zoe, Myriam, Kateri, Valérie, Sarah-Anne, Gabriel, Marlène, Candice, à mes collègues de l'USB et tous les autres qui m'ont encouragée et supportée malgré la distance dans cette aventure. À ma famille Montréalaise, Christine, Francine, Odette, Nicole, Geneviève, Marc et Victor, toute cette expérience était tellement plus facile et amusante grâce à vous.

Enfin, merci à ma famille. Claudine, je suis tellement fière de toi et tu me motives à dépasser mes limites. Papa et maman, merci pour votre support inconditionnel, c'est aussi en vous voyant travailler si fort que je me suis rendue ici. Vos efforts continuels pour assurer ma réussite sont des plus appréciés.

Du fond de mon cœur, merci!

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1.1. Découverte :

En 1981, aux États-Unis, les premiers cas d'une insuffisance immunitaire sont documentés dans la communauté homosexuelle. Une forte incidence de sarcome de Kaposi, d'infection à *Pneumocystis carinii*, au cytomégalovirus et à la *Candida* semblent pointer vers un syndrome d'immunodépression chez ces individus[1]. On découvre alors que tous les patients présentent une déficience en lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique[2, 3]. À l'époque, les données épidémiologiques indiquent que ce que l'on a baptisé le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est propagé par un nouvel agent infectieux. C'est 2 ans après le début de l'épidémie de SIDA, en 1983, que l'agent causal est identifié à l'institut Pasteur de Paris par le groupe de Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montaigner. Le virus isolé par l'équipe de Paris fut nommé *lymphadenopathy-associated virus*. Presqu'en même temps, l'équipe de Robert Gallo au *National Institute of Health* (NIH) isole un virus qu'ils nomment *human T-cell leukemia virus III* (HTLV-III) pour ses similarité aux autres virus HTLV dont le tropisme pour les lymphocytes T [2]. On réalise que les deux équipes ont identifié le même virus et le nom de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est finalement adopté.

Le VIH-2 est découvert en 1986 chez des individus d'Afrique de l'ouest[3]. Ce virus est apparenté au VIH-1 mais est moins virulent et concentré géographiquement en Afrique.

1.2. Origine :

Il existe quatre sous-types du VIH-1 qui proviennent de différents événements de transmission du virus de l'immunodéficience simienne (VIS), trois du chimpanzé (*Pan troglodytes*) : M (main), N (non-M, non-O), O (outlier) et P qui descend d'un virus du gorille [3-5]. Le groupe M qui regroupe plus de 98% des virus mondiaux est divisé en 9 clades (A, B, C, D, F, G, H, J, et K), tous sont retrouvés sur le continent Africain mais le clade B est le plus commun en Amérique du Nord et en Europe, ce qui fait de lui le virus

le plus étudié [3]. Les virus du groupe O sont trouvés au Cameroun, au Gabon et en Guinée Équatoriale, leur génome est partagé à environ 65% avec les virus du groupe M. Enfin, les groupes N et P sont retrouvés uniquement au Cameroun. Le VIH-2 est un descendant du VIS_{sm} du Mangabey (*Cerocebus atys*) et compte sept sous-groupes [3, 6].

1.3. Structure du virus :

Le VIH fait partie de la famille des *Retroviridae* et appartient au genre *Lentivirus* [3]. Ainsi, il est un virus enveloppé dont le matériel génétique est réparti sur 2 copies de brin négatif d'ARN. Avec son enveloppe, le VIH-1 a un diamètre d'environ 120 nm, celle-ci provient des cellules infectées et est obtenue lors du bourgeonnement du virus. L'enveloppe est recouverte des glycoprotéines gp120 et gp41, essentielles pour l'entrée du virus. Une capside de forme conique composée de la protéine virale p24 renferme la nucléocapside contenant l'ARN ainsi que les enzymes nécessaires au virus : la transcriptase inverse, protéase, ribonucléase et l'intégrase. Enfin, une matrice de protéines p17 isole la capside de l'enveloppe.

1.4. Génome viral :

Contrairement aux rétrovirus typiques qui ont trois gènes structuraux, le génome du VIH-1 contient 9 gènes, les trois gènes structuraux communs à tous les rétrovirus (*gag*, *pol*, *env*) ainsi que *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* qui sont nécessaires pour la pathogénèse virale. Ces 9 gènes encodent 15 protéines réparties sur plusieurs cadres de lecture du génome [3]. Les gènes *gag*, *pol* et *env* encodent les protéines structurales et enzymes essentielles au virus. Le précurseur-Gag (Pr55^{Gag}) est clivé pendant ou après le relâchement des virions pour produire les protéines de la matrice (p17), capside (p24), nucléocapside (p7), 2 'spacers' (SP1 et SP2) ainsi que p6. Une autocatalyse de Gag-Pol (Pr160^{Gag-Pol}) produit les enzymes virale protéase, transcriptase inverse et intégrase. Enfin, une digestion protéolytique converti Env (gp160) en gp120 et gp41, les glycoprotéines de l'enveloppe [3]. Les protéines dites accessoires codées par *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* seront discutées dans la section suivante sur la réplication virale.

1.5. Cycle de réplication :

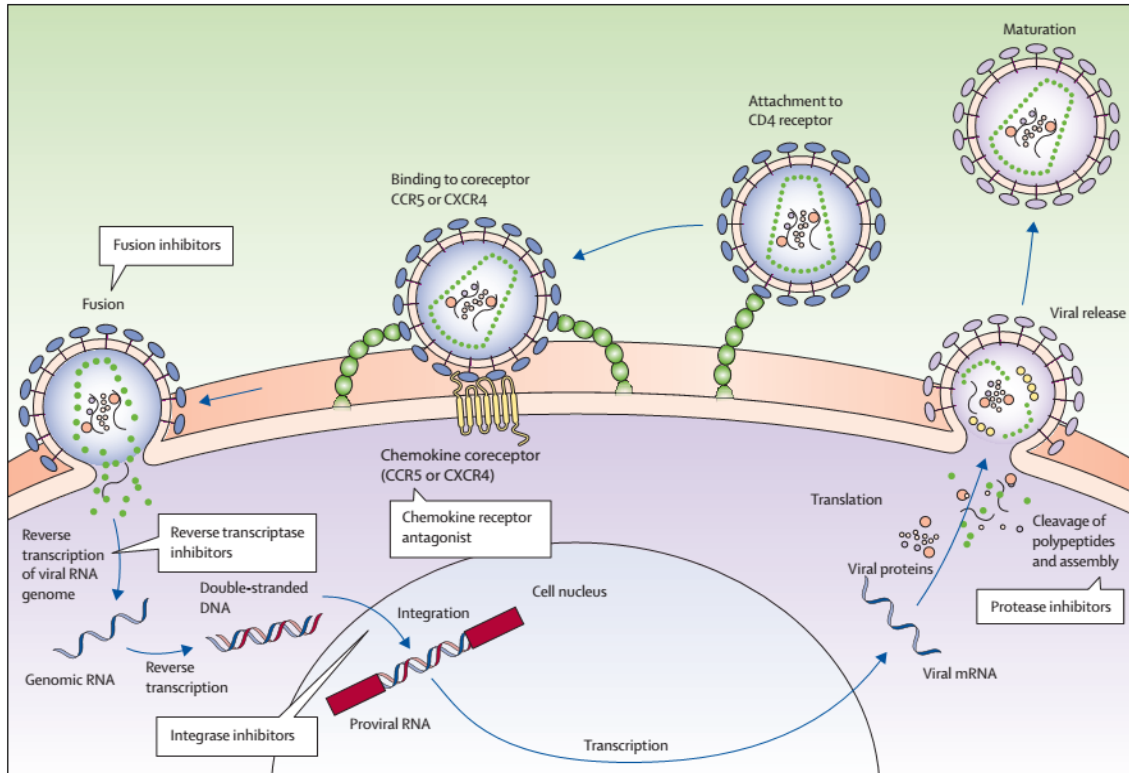


Figure 1. Cycle de réplication du VIH et action des antirétroviraux tirée de Maartens G., Celum, Connie, Lewin, S. R. (2014) HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention [5].

Le cycle de réplication du VIH-1 présente une phase précoce et une phase tardive, il implique des protéines virales ainsi que des protéines de la cellule hôte.

1.5.1. Phase précoce – adsorption, fusion, décapsidation, transcription inverse, intégration

La première étape du cycle est l'attachement ou adsorption. Le trimère de gp120 à la surface virale se lie à son récepteur cellulaire la protéine CD4, cette liaison engendre un changement de conformation qui expose le site de liaison du co-récepteur. Les co-récepteurs du VIH sont des récepteurs à chimiokines couplés à la protéine G (Voir section 4.2 sur les récepteurs), plusieurs ont la capacité de jouer ce rôle mais deux récepteurs sont prédominant *in vivo* soit CXCR4 ou CCR5 [3]. On sépare les souches de

VIH-1 selon le co-récepteur préférentiellement utilisé. Les virus qui emploient CCR5 sont baptisés R5 et ceux qui se servent de CXCR4 sont des souches X4. Il existe également des virus qui utilisent autant les 2 co-récepteurs. Ces virus bi-tropiques sont R5/X4 [3]. Le virus ainsi bien ancré, la gp41 est exposée et transperce la membrane cellulaire. Gp41 prend alors sa forme fusogénique et permet de rapprocher les membranes virales et cellulaires facilitant la fusion de ces dernières. La particule virale pénètre alors dans la cellule.

L'étape suivante est la décapsidation qui permet de libérer l'ARN et les enzymes virales dans la cellule hôte. Ceux-ci sont transportés vers le noyau par les microtubules et durant cette étape, l'ARN est transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse. Cet ADNc peut alors être intégré dans le chromosome de l'hôte avec l'aide de l'intégrase.

1.5.2. Phase tardive – transcription, épissage, traduction, assemblage, bourgeonnement

Le reste du cycle viral nécessite l'emploi de la machinerie cellulaire. Le provirus est transcrit en ARNm par l'ARN polymérase-II puis coupé en plus petits morceaux via un processus d'épissage [3]. Ces segments peuvent être exportés au cytoplasme où ils seront traduits en protéines Tat et Rev. Ces protéines retournent alors au noyau où Tat interagit notamment avec NF-kB, ARN Polymérase-II et Sp1 pour produire de grandes quantités d'ARNm viral. Rev participe au transport vers le cytoplasme de segments d'ARNm semi- ou non-épissé [3], ceux-ci peuvent alors être traduits en Gag et Env. L'ARN étant aussi le génome viral, il est empaqueté, en se liant à Gag, pour former de nouveaux virions. Avant de sortir de la cellule hôte, il y a une étape d'assemblage. La protéine Env (gp160) passe par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pour ensuite être clivée en gp120 et gp41. Ces glycoprotéines s'installent sur la membrane externe et seront rejointes par Gag (p55) et Gag-Pol (p160) pour commencer à former le virion au début de l'exocytose. Les protéines Gag sont ensuite clivées pour produire la matrice, capsid et nucléocapsid qui vont former le virion mature.

Vif, Vpr, Vpu et Nef ne sont pas impliqués dans la réplication mais sont importants pour augmenter l'infectiosité du virus en contrant l'action des facteurs de restriction

humains[3]. Vif (*viral infectivity factor*) est un facteur du VIH qui permet au virus de se répliquer en bloquant l'action d'APOBEC3G (*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide*) par son ubiquitination et dégradation subséquente par protéasome [7]. Vpr (*viral protein R*) a plusieurs effets sur la cellule et le cycle du VIH, notamment la capacité d'arrêter le cycle cellulaire en phase G₂, d'influencer l'apoptose des lymphocytes T et d'aider la réplication dans les macrophages [8]. Vpu (*viral protein U*) dégrade le facteur de restriction Tetherin/BST2 (*bone marrow stromal-cell antigen 2*) qui ancre les virions à la membrane et empêche ainsi la propagation du virus [9]. Finalement le facteur négatif Nef est lui aussi multifonctionnel, on le connaît pour son rôle dans l'altération du trafficking vésiculaire et sa capacité à perturber la signalisation cellulaire entre autre en favorisant l'internalisation de CD4. Ceci permet à une cellule infectée d'échapper au système immunitaire en évitant d'être reconnue comme infectée [10]. Nef affecte également le complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) en bloquant l'exportation des complexes nouvellement synthétisés ainsi qu'en augmentant l'internalisation du CMH-I de surface pour sa dégradation dans les lysosomes [11] Il a également été démontré que Nef peut être relâché et sa présence, soluble ou à l'intérieur d'exosomes, est détectable dans le sang de patients infectés. Ainsi, Nef a la capacité de pénétrer dans d'autres types cellulaires et d'affecter leurs fonctions [12].

Le VIH-1 mature cible majoritairement les lymphocytes T CD4⁺, mais peut également infecter les macrophages et certaines cellules dendritiques.

1.6. Cellules cibles du VIH-1

Les virus à tropisme CCR5, aussi nommés M-tropiques pour leur capacité à infecter les macrophages, sont prédominants pendant la phase asymptomatique de l'infection. Le co-récepteur CCR5 est présent sur les lymphocytes T CD4 mémoires qui sont retrouvés en grands nombres dans les tissus périphériques tels le tractus gastro-intestinal. Ces cellules représentent une population de cellules mémoires effectrices différenciées qui provient de précurseurs ayant mûri dans les tissus lymphoïdes secondaires[13]. Le récepteur CXCR4 est présent sur les T CD4 naïfs et mémoires qui représentent 80-95% des lymphocytes du sang périphérique. Les virus utilisant le co-récepteur CXCR4 sont

aussi identifiés comme T-tropiques puisqu'ils se répliquent préférentiellement dans les lymphocytes T (Voir section 3.2.1 phase aigüe).

La transmission du virus aux cellules avoisinantes peut se faire par un virion libre ou directement d'une cellule à une autre via une synapse virologique. Cette méthode qui utilise des composantes de la synapse immunologique se produit entre lymphocytes T cibles et lymphocytes T ou cellules dendritiques (DC). La *trans*-infection par synapse virologique est influencée par plusieurs facteurs autant cellulaires que viraux. Par exemple, il a été démontré que la co-expression de DC-SIGN et CD4 sur les DC inhibait la transmission du virus en retenant celui-ci dans le cytoplasme de la cellule. Au contraire, la protéine virale Nef augmente l'efficacité de la *trans*-infection. [3, 13, 14].

Le VIH-1 peut infecter les macrophages qui sont au stade G₁ du cycle cellulaire. Le complexe de pré-intégration, comprenant l'ADNc et l'intégrase, est transloqué dans le noyau par les pores nucléaires. Au niveau des muqueuses vaginales, les macrophages partageant toujours des caractéristiques avec les monocytes sont particulièrement susceptibles à une infection par le VIH-1[14]. Le virus peut se propager au système nerveux central (SNC). Le mécanisme exact de cette dissémination ne fait pas l'unanimité mais les macrophages ou monocytes sont impliqués. Une augmentation importante des monocytes CD14+CD16+ est observée chez les individus présentant une démence associée au VIH. Ces monocytes ont une fonction se rapprochant de celle des macrophages dans le sang et peuvent être infectés par le VIH-1. De plus, le virus retrouvé dans le SNC est M-tropique indiquant qu'il a fort probablement été amené par un macrophage infecté [15].

Des symptômes neurologiques du SNC et périphérique sont observés dans 40-70% des individus séropositifs. Le cerveau agit aussi comme un réservoir car les traitements antirétroviraux ne pénètrent généralement pas la barrière hémato-encéphalique.

Les DC (myéloïdes et plasmacytoïdes) sont des cellules de première ligne et souvent les premières à rencontrer le virus lors de la transmission sexuelle car ces cellules sont présentes aux muqueuses. En tant que cellules présentatrices d'antigènes, les DC myéloïdes transportent le VIH (capturé via DC-SIGN qui lie gp120) vers les ganglions

lymphatiques où les particules virales sont présentées aux lymphocytes T CD4+, qui sont la cible de choix du VIH-1 [3]. Les DCs, surtout les immatures, peuvent également être infectées et transmettre le virus par synapses virologiques. Ces cellules, une fois infectées, peuvent aussi servir de réservoir de virus latent [14] (Voir section 3.2.4).

2. Lymphocytes B :

2.1. Origine et différenciation

Les lymphocytes B font partie d'un groupe de cellules produites continuellement tout au long de la vie. Ces cellules arrivent à maturation dans la moelle osseuse après différenciation à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Les cellules souches produisant les lymphocytes B se différencient en un précurseur lymphoïde commun (CLP) pouvant mener à des lymphocytes T, B ou NK. À partir des CLP, les cellules passent par une gamme de précurseurs et de cellules immatures pour enfin donner les lymphocytes B matures [16]. Les différents stades de développement, pro-B, pré-B et B immature sont définis par l'expression de marqueurs de surface ainsi que par des réarrangements des chaînes lourde (H, heavy) et légères (L, light) de l'immunoglobuline (Ig). Ces réarrangements permettent l'expression du pré-BCR (*B-cell receptor*) formé de la chaîne μ et des composants V-preB $\lambda 5$ de la chaîne L qui permet la progression du stade pro-B vers pré-B et le réarrangement de la chaîne légère. Les cellules pré-B procèdent ensuite au réarrangement des chaînes kappa et lambda ce qui mène à l'expression d'IgM et au stade de cellule B immature. Ces cellules ont un BCR dont la réactivité va déterminer le reste du parcours de maturation [17, 18]. Les cellules B immatures transitionnelles dont le BCR est trop autoréactif subissent une délétion clonale alors que celles qui ont bien édité leur BCR et dont l'auto-réactivité est faible pourront sortir de la moelle osseuse pour se rendre dans la rate et terminer leur maturation [19]. Les cellules B sont formées dans la moelle osseuse mais plusieurs populations sont détectables dans le sang où ces cellules circulent pour atteindre d'autres organes. Les lymphocytes B naïfs à la recherche d'antigènes sont généralement les plus représentés dans le sang périphérique mais on retrouve également des lymphocytes B mémoires qui se dirigent vers les régions où s'accumulent des antigènes telles que la zone marginale et les muqueuses. Les cellules plasmatisques et les plasmablastes sont des cellules matures

qui sont également présentes dans le sang. On retrouve aussi dans la circulation quelques lymphocytes B immatures qui s'apparentent aux cellules appelées transitionnelles chez la souris [20].

2.2. Maturation dans la rate et décision du type cellulaire

Les cellules transitionnelles immatures $\text{IgM}^+\text{CD21}^+$ arrivant dans la rate peuvent prendre deux formes, lymphocytes B folliculaires ou de la zone marginale. Les follicules regroupant des lymphocytes B sont adjacents à une zone lymphoïde T dans la rate. Les follicules B et zones T sont entourées de la zone marginale qui est composée de macrophages et de lymphocytes B. Ces cellules représentent une première ligne de défense contre les pathogènes du sang [21]. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer le lignage des cellules transitionnelles immatures. Le premier facteur est la puissance du signal transmis au BCR. Selon des études chez le modèle murin, les cellules B qui progressent vers la zone marginale (MZ) reçoivent un signal faible. Les lymphocytes B immatures sont attirés à la rate par Delta-like 1 (DL1), ligand important pour le développement des lymphocytes B de la zone marginale, qui n'est pas exprimé dans la moelle osseuse. Une liaison efficace de DL1 à son récepteur Notch2 est seulement possible dans la zone marginale. Le facteur de survie pour les lymphocytes B, BLyS/BAFF, produit par les DC avoisinants, est également requis pour le développement des cellules dans la zone marginale. Son rôle, contrairement à la zone folliculaire, est plutôt pour hausser les niveaux d'expression de NF- κ B. Lorsque le signal BCR est plus fort, la voie Notch2 n'est pas activée et les cellules immatures vont plutôt se différencier en cellules B folliculaires. BLyS/BAFF est présent en grande quantité dans les follicules pour aider à la survie des lymphocytes B [19, 21, 22].

Les cellules B folliculaires et de la zone marginale ont des fonctions distinctes et complémentaires en fonction de leur localisation. Les cellules de la MZ sont les premières à entrer en contact avec les pathogènes du sang. Ces cellules sont en mesure de réagir de façon T-indépendante aux antigènes tels que les capsules bactériennes. Contrairement à leur équivalent murin, les cellules B de la MZ humaine ont la capacité de circuler hors de la MZ et sont retrouvées dans d'autres organes lymphoïdes périphériques [23]. Les lymphocytes B folliculaires ont une courte durée de vie et possèdent la capacité

de circuler entre le sang et les organes lymphoïdes. Ces cellules agissent de façon T-dépendante et sont impliquées dans la formation de centres germinatifs où a lieu la maturation de l'affinité. Okada *et al* ont démontré que les lymphocytes B ayant rencontré un antigène se déplacent vers la bordure entre le follicule et la zone T en suivant un gradient de la chimiokine CCL21. Une interaction entre les cellules B et lymphocytes T auxiliaires (Th) a lieu à la bordure et permet de compléter la réponse humorale [24]. Les cellules B matures seront ensuite différenciées soit en plasmocytes pour produire des immunoglobulines ou en cellules B mémoires [25, 26].

2.3. Activation des lymphocytes B

La fonction principale des lymphocytes B est la production d'anticorps pour combattre une invasion du système immunitaire. L'activation des lymphocytes B peut se faire de façon dépendante ou indépendante d'une interaction avec les lymphocytes T et entraîne la différenciation en cellules plasmiques et B mémoires.

Le premier type d'activation, la réponse T-dépendante, nécessite l'aide de lymphocytes Th pour optimiser la production d'anticorps. La première étape de l'activation est la liaison d'un antigène au BCR d'un lymphocyte B. Cet antigène pénètre dans la cellule par endocytose et sera dégradé pour être présenté à la surface de la cellule B via le complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Cette première activation permet à la cellule B d'être permissive aux signaux subséquents présentés par les cellules Th. La cellule B agit ensuite comme cellule présentatrice d'antigène (APC) auprès d'une cellule Th qui aura préalablement rencontré l'antigène lors d'une présentation par une APC, telle qu'une DC. Le TCR de la cellule Th se lie ensuite à l'antigène présenté par le CMH-II. En même temps, le récepteur CD40 se lie au CD40L pour former une synapse immunologique qui provoque l'activation de la cellule T. Cette dernière peut ensuite produire les cytokines et autres protéines nécessaires pour activer la cellule B. La combinaison de ces signaux permet d'activer les cellules B qui se déplacent vers une région spécialisée où elles vont se différencier en plasmocytes produisant des anticorps. Certaines cellules activées migrent aux follicules des ganglions et de la rate pour former des centres germinatifs où ont lieu la recombinaison de commutation de classe et

l'hypermutation somatique permettant de générer des lymphocytes B mémoires spécifique à l'antigène [23, 27].

L'activation T-indépendante (TI) par des antigènes polymérisés des cellules B ne mène pas à la formation de centres germinatifs mais permet une réponse rapide. Dans un premier cas, l'activation T-indépendante de type 1 peut se produire lorsque la cellule B reçoit son signal d'activation secondaire par l'activation des TLR4 ou TLR9. Un exemple typique d'antigène est le LPS bactérien. Cette forme d'activation permet majoritairement la production d'IgM qui seront spécifiques à l'antigène. La production d'IgG et d'IgA est également possible grâce à BLYS/BAFF qui recrute la protéine adaptatrice MyD88 au récepteur *Trans-membrane Activator and CAML Interactor* (TACI), l'interaction TACI-MyD88 active la chaîne NF- κ B pour permettre une commutation de classe isotypique (class switch) [28]. L'autre méthode d'activation TI (type 2) se produit lorsque l'antigène à la surface d'un pathogène est présent de façon répétitive et capable de lier plusieurs BCR et autre Ig membranaires. Cette liaison multiple permet l'activation de *Bruton's tyrosine kinase* qui déclenche la cascade d'activation de la cellule B en vue de la production d'anticorps [29, 30]. Les monocytes, macrophages et DC peuvent renforcer la réponse TI de type 2 en produisant BLYS/BAFF qui se lie aux cellules B via le récepteur TACI pour activer des facteurs de transcription permettant la sécrétion d'anticorps et aidant à la survie cellulaire. Les lymphocytes T peuvent également contribuer à la réponse TI-2 en produisant des cytokines [23].

Les lymphocytes B sont surtout connus pour leur rôle dans l'immunité humorale, la production d'anticorps, mais ces cellules participent aussi à l'initiation de la réponse des lymphocytes T, particulièrement pour les lymphocytes T CD4⁺ [31]. La régulation du développement, de la prolifération et du maintien des lymphocytes T CD4⁺ est assurée par un type de cellules nommées B régulatrices (Bregs). Ces cellules forment une population difficile à définir qui est caractérisée par la production d'IL-10 et activée via CD40 [32]. Les Bregs sont aussi reconnues pour supprimer la fonction des lymphocytes T effecteurs [33]. D'ailleurs, Siewe *et al.* ont démontré que les Bregs empêchent l'action des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques par un mécanisme dépendant d'IL-10 dans le contexte du VIH-1 et que la fréquence des Bregs corrèle avec la charge virale et

l'épuisement des T CD8⁺. De plus, l'infection au VIH-1 encourage l'activation de ces cellules par la présence de CD40L et l'activation via TLR2 et 9. Des études récentes menées dans notre laboratoire auprès d'individus infectés par le VIH-1 démontrent que la fréquence de cellules B exprimant IL-10 est augmentée dans le sang des progresseurs rapides et classiques par rapport aux contrôles sains, particulièrement pour les populations transitionnelles immatures, mémoires et chez les précurseurs de la MZ [34]. Entre autre, cette augmentation de la production d'IL-10 peut contribuer au déséquilibre entre les cellules T régulatrices et T effectrices décrit chez les individus infectés par le VIH-1 [35]. De plus, il a été démontré *in vitro* que de hauts niveaux de Bregs peuvent nuire à l'activité antivirale des T effecteurs [33]. Cependant, chez les contrôleurs élites, dans lesquels on ne détecte pas le virus, la fréquence de cellules précurseurs de la MZ qui sécrètent l'IL-10 est maintenue au même niveau que les contrôles. Cette observation suggère que les contrôleurs élites ont la capacité de réguler la production d'IL-10 [34].

3. Pathogénèse du VIH et SIDA :

Les données de l'organisation mondiale de la santé indiquent qu'en date de 2013, 35 millions de personnes vivaient avec le VIH-1. 2,1 millions représentent de nouvelles infections et en 2013 1,5 millions d'individus sont décédés des suites du SIDA [36]. Le plus récent rapport de ONU SIDA indique que les nouveaux cas d'infections ainsi que les décès causés par le SIDA sont en baisse dans plusieurs régions du globe grâce à l'amélioration de l'accessibilité aux traitements et aux programmes de prévention et d'éducation [37].

3.1. Transmission

Le VIH se transmet de façon horizontale, sexuellement et par le sang ainsi que verticalement d'une mère à l'enfant. La grande majorité des nouvelles infections sont transmises sexuellement et dans les pays développés l'incidence est plus élevée dans la communauté homosexuelle [3, 38]. En Afrique, une portion importante de la transmission demeure hétérosexuelle alors que les femmes sont dans des situations d'injustice sociale [37]. La transmission par les muqueuses se fait généralement par un virus fondateur utilisant CCR5 comme co-récepteur. Ce virus peut plus facilement infecter les DC ainsi

que les cellules de Langerhans qui sont présentes dans les muqueuses [5]. Historiquement le mode de transmission le plus commun était via la transfusion de sang contaminé mais tous les échantillons sont surveillés de près aujourd'hui[3]. La transmission parentérale est tout de même présente chez les usagers de drogues intraveineuses ou chez le personnel de la santé. Enfin, une transmission mère-enfant est également possible soit durant la grossesse, lors de l'accouchement ou pendant l'allaitement.

3.2. Phases de l'infection

La pathogénèse d'une infection au VIH se divise en 3 phases soit la primo-infection ou phase aigüe, la phase asymptomatique ou chronique et la phase SIDA. Dans les cas classiques, le temps entre l'infection primaire et le stade SIDA est de huit à dix ans [39] mais cette durée varie grandement selon le type de progression (Voir section 3.3).

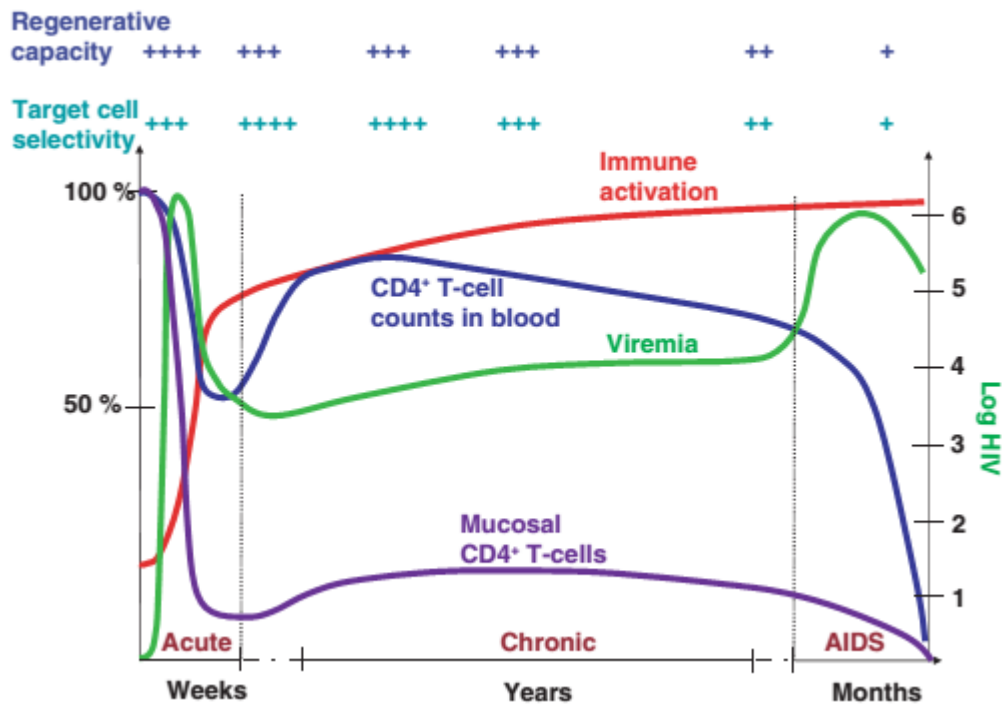


Figure 2. Progression de l'infection au VIH. Tiré de Grossman, Z., et al. (2006) *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys.* [13]

3.2.1. Phase aigüe

La primo-infection est la période directement après l'entrée du virus dans l'organisme, elle dure habituellement quelques semaines. Il s'en suit, environ deux à quatre semaines plus tard, une période pendant laquelle la plupart des individus infectés présentent des symptômes grippaux. À ce stade, on détecte facilement le virus dans la circulation sanguine. Sans traitement, il faut environ trois semaines pour que la virémie atteigne son sommet avant de diminuer [38]. Dans la majorité des infections, le virus pénètre par les muqueuses qui sont fortement peuplées de DC et lymphocytes T CD4⁺. En effet, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) comprennent la majorité des cellules T CD4⁺ du corps dont une grande partie expriment également le co-récepteur CCR5 [6]. Après avoir rencontré le virus dans les muqueuses, les DCs en tant que cellules présentatrices d'antigènes, migrent vers les ganglions drainants pour présenter les antigènes du VIH-1 aux lymphocytes T CD4⁺, cellules cibles du virus. Puisque la souche R5 est prédominante au début de l'infection, on dénote une baisse importante des lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ du MALT [6] mais cette diminution est moins évidente dans le sang où seulement 5-10% des lymphocytes T expriment CCR5 [13]. L'infection par le virus fondateur s'accompagne d'une réplication rapide et d'une forte réponse inflammatoire. Lors de transmission sexuelle, des cellules dendritiques plasmiques CCR6⁺ sont recrutées avec des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que des macrophages vers l'épithélium endocervical et contribuent à la dissémination du virus à travers l'organisme [40]. Les effets du virus permettent d'activer des lymphocytes T CD4⁺ qui deviennent alors des cibles idéales pour le VIH-1 (section 1.6). Un autre type de lymphocytes T, les lymphocytes T auxiliaires Th17 retrouvés dans les muqueuses offrent une première ligne de défense contre les pathogènes. Lors d'une infection au VIH-1, la fonction et le nombre de ces cellules sont réduits de façon importante. La cause de cette déplétion demeure incertaine, mais une variation dans le recrutement via la chimiokine CCL20 et son récepteur CCR6 pourrait être en cause [41]. Une importante diminution des nombres de cellules B mémoires effectrices est aussi remarquée dans les muqueuses. Lors de la phase symptomatique, le phénomène de *co-receptor switching* se produit et la souche X4 devient prédominante. C'est à ce moment que l'on remarque la baisse de lymphocytes T CD4⁺CXCR4⁺ dans le sang. Vers la fin de la phase aigüe, les

lymphocytes T CD4⁺ infectés sont ciblés par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et la réponse humorale dont l'action combinée permet de stabiliser la réplication virale pour laisser place à la phase chronique de l'infection. On dit que la virémie atteint un « set point » qui sera maintenu pendant la phase chronique. La charge virale de ce « set point » peut indiquer le type de progression.[6, 38]

3.2.2. Phase chronique

La phase aigüe est suivie d'une période asymptomatique qui s'étend sur plusieurs années et dont la durée varie selon l'individu [6]. Pendant cette phase chronique, le virus continue de se répliquer et le système immunitaire tente de combattre le virus ainsi que les infections opportunistes qui peuvent survenir [6]. On remarque une diminution graduelle du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et une activation immunitaire chronique. Cette activation a été étudiée chez les singes où l'on démontre que les cellules T mémoires effectrices sont grandement affectées dans la phase aigüe de l'infection. Au cours de la phase chronique, l'organisme ne réussit pas à remplacer les cellules T CD4⁺ dans les muqueuses car les structures nécessaires sont sévèrement endommagées par le virus au cours de la primo-infection. L'absence d'un nombre suffisant de cellules B mémoires effectrices contribue à la progression de la maladie [42].

3.2.3. Phase SIDA

De façon générale, un individu atteint la phase SIDA lorsque les comptes de lymphocytes T CD4⁺ sont inférieurs à 200 cellules/mm³. L'utilisation commune de traitements antirétroviraux empêche d'affirmer que tous les individus séropositifs atteignent cette phase [43]. Durant la phase SIDA, l'état compromis de l'immunité fait en sorte que les individus sont facilement infectés par des pathogènes opportunistes d'origines viraux, bactériens, fongiques ou parasitaires.

3.2.4. Réservoirs

Les réservoirs sont des cellules ou tissus qui permettent au virus de survivre dans le corps en évitant les traitements antirétroviraux. D'après des études avec le virus d'immunodéficience simienne, ce type d'infection latente se produit dès les premiers

jours de l'infection et persiste vraisemblablement pour toute la durée de vie des individus infectés [44]. Le virus peut refaire surface si les traitements antirétroviraux sont arrêtés. Des recherches chez le singe démontrent que l'administration rapide d'antiviraux suite à l'entrée du virus diminue de beaucoup le nombre de virus qui passent au cycle de latence. Le VIH est présent dans le tractus gastro-intestinal (GI) et MALT tout au long de l'infection malgré la diminution importante des lymphocytes T CD4⁺ pendant la phase aigüe [38]. Il a aussi été constaté que les cellules dendritiques folliculaires servent de réservoir dans les centres germinatifs (GC) en formant des complexes immuns par la capture de plusieurs virions qu'ils exposent aux T CD4⁺ [14, 45]. Malgré l'efficacité des traitements antirétroviraux, le VIH peut survivre en infectant des cellules de façon latente. C'est-à-dire que l'ADN du virus est intégré au génome cellulaire, sous forme de provirus, sans toutefois produire de virions. Ceci peut se produire lors de l'infection de lymphocytes T CD4⁺ au repos en présence de certaines chimiokines ou lorsqu'une cellule infectée retourne à un statut de repos. Des réservoirs viraux sont présents dans les organes lymphoïdes, le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central tel qu'illustré par la présence d'ADN viral latent dans des monocytes, macrophages et dans des astrocytes qui notamment, peuvent relâcher la molécule virale Nef [5]. Cet ADN peut être réactivé si la cellule subit un stress et de nouveaux virus seront sécrétés. Plusieurs tentent aujourd'hui de trouver une façon d'éliminer ces réservoirs afin de guérir l'infection au VIH-1. La solution proposée consiste par exemple en une réactivation des réservoirs viraux combinée à une immunothérapie pour augmenter l'immunité spécifique anti-VIH-1.

3.3. Types de progression clinique

Nous divisons les patients infectés par le VIH en trois catégories selon leur charge virale et la vitesse à laquelle ils atteignent le stade SIDA

3.3.1. Rapides : Environ 10-15% des individus infectés progressent rapidement vers l'immunodéficience [39]. C'est-à-dire qu'en moins de deux ou trois ans, le compte de cellules T CD4⁺ est inférieur à 250 cellules/mm³ [46]. La phase aigüe peut être prolongée et les symptômes peuvent persister même pendant la phase chronique qui est parfois inexistante. Ces patients

peinent à baisser et maintenir un contrôle sur la virémie et seront rapidement placés sous traitement antirétroviral.

3.3.2. Classiques : Les progresseurs classiques, qui représentent de 70 à 80% des infections, maintiennent un niveau de cellules T CD4⁺ supérieur à 500 cellules/mm³ après 2 ans d'infection. Suite à la phase aigüe, on voit chez ces individus une longue phase asymptomatique mais durant laquelle le virus continue à se multiplier et les T CD4⁺ diminuent lentement [39]. Il faut huit à dix ans pour que ces individus progressent à la phase SIDA.

3.3.3. Progresseurs lents : Le dernier groupe, représentant autour de 5% des cas, sont les progresseurs lents ou LTNP (*long term non-progressors*). Il s'agit d'individus infectés mais asymptomatiques chez qui la maladie ne semble pas progresser, les comptes de cellules T CD4⁺ sont normaux ou élevés par rapport aux autres groupes. Pour notre étude, ce groupe est composé de sujets infectés depuis 8 ans ou plus qui maintiennent un niveau de T CD4⁺ supérieur à 500 cellules/mm³ et dont la charge virale est faible ou indétectable[39, 46]. On divise ce groupe en LTNP virémiques, chez qui la charge virale est faible mais détectable, et avirémiques ou contrôleurs élites, où l'on ne peut pas détecter de virus pas les techniques classiques. Ces contrôleurs élites représentent environ 1% des individus infectés [47].

3.4. Traitements

Selon ONUSIDA, en 2013 environ 12.9 millions d'individus recevaient un traitement antirétroviral et le pourcentage de gens infectés non-traités est en déclin[37]. Les antiviraux sont divisés en 6 classes selon leur mécanisme d'action : les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs de la transcriptase inverse, qui peuvent être nucléosidiques ou non-nucléosidiques, les inhibiteurs d'intégrase et finalement les inhibiteurs de la protéase. Chacune des classes agit à une différente étape du cycle de réplication du virus (Figure 1)[48]. En 2014, il existe une trentaine de médicaments antirétroviraux approuvés par la Food and Drug Administration, ceux-ci sont utilisés en

combinaison de trois ou quatre à la fois en diversifiant les mécanismes d'action, généralement deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et un troisième appartenant à une autre classe [48-50]. On appelle cette combinaison de traitements *highly active antiretroviral therapy* (HAART, ou ART). Les traitements permettent de réduire la charge virale et de maintenir les patients relativement en santé. Ils sont plus efficaces lorsque débutés tôt suite à la primo-infection mais les effets bénéfiques ne sont pas négligeables même lors de traitements plus tardifs. En effet, la virémie chute à des niveaux indétectables après environ 3 mois de traitement [5]. Cependant, la haute fréquence de mutations du VIH, causée par la faible fiabilité de la transcriptase inverse, fait en sorte que le virus développe facilement une résistance contre certains des médicaments, les rendant inactifs. Malgré les traitements, plusieurs des symptômes causés par le VIH-1 sont irréversibles. En effet, la dérégulation des cellules B (voir section 3.6) n'est jamais entièrement rétablie même avec ART et la composition du compartiment de cellules B est différente chez les individus infectés par rapport aux contrôles sains même après un traitement. Ces détails seront discutés plus longuement dans les sections suivantes. Il est également important de considérer le moment auquel le traitement est initié, l'administration de ART tôt durant la phase aiguë permet un meilleur rétablissement du système immunitaire que lorsque les traitements sont différés [51]. Le virus est à son plus vulnérable dans la première semaine d'infection. À ce moment, ART est en mesure de prévenir la dissémination du virus fondateur dans l'organisme. Malheureusement, il est très difficile de détecter une infection assez tôt pour démarrer les traitements dans la première semaine. En plus des traitements antirétroviraux actuels, beaucoup d'énergie est consacrée à la recherche pour la mise au point d'un vaccin ou autre méthode pour prévenir l'infection par le VIH. Tel que décrit par Haase [40], il y a deux objectifs pour une intervention vis-à-vis le VIH-1, soit la prévention d'une infection systémique en autres mots le contrôle d'une infection déjà acquis par ART et la prévention de l'acquisition d'une infection primaire qui serait assurée par un vaccin ou autre traitement prophylactique. Bien que beaucoup de progrès est fait chaque année, une telle solution n'est toujours pas disponible.

3.5. Impacts de la pathogénèse chez l'hôte

3.5.1. Dérégulation du système immunitaire

La production d'anticorps polyclonaux et spécifiques par des cellules plasmiques et par des plasmablastes (court terme, spécifique à l'infection quoique seule une petite fraction des plasmablastes soit spécifique au VIH), est directement liée à la virémie et disparaît suite aux traitements [45].

Un symptôme déterminant de la progression d'une infection au VIH est une activation immunitaire importante [52-54] qui est un indicateur de la progression vers le SIDA. On observe cette activation très tôt dès la phase aiguë de l'infection chez les progressseurs rapides et classiques. En plus de l'épuisement des lymphocytes T CD4⁺, l'infection au VIH engendre une dérégulation des cellules T CD8⁺, DC, des cellules tueuses naturelles (NK) et des lymphocytes B [38]. Cette dérégulation est visible par une augmentation du renouvellement cellulaire, de l'activation et la différenciation des lymphocytes T ainsi que par une activation polyclonale des lymphocytes B et une hausse des niveaux de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires dans le sang. On observe également une diminution des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) dans le sang des progressseurs rapides et classiques probablement causée par un recrutement de ces cellules vers les organes périphériques en réponse à des chimiokines [55]. Tous ces symptômes ne sont pas entièrement rétablis par ART [38, 52]. De plus, l'activation immunitaire génère des lymphocytes T activés qui sont la cible de choix du virus. Les avancées récentes portent à croire que ce n'est pas le virus en tant que tel qui cause la perte de lymphocytes T CD4⁺ et l'immunodéficience mais bien l'activation immunitaire, due à des effets directs et indirects du virus, qui résulte en immunodéficience [53].

Durant l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont activés et prolifèrent plus rapidement. Ces cellules ont aussi une demi-vie beaucoup plus courte ce qui fait en sorte que le *turnover* cellulaire (autant la production que la mort) des lymphocytes T est augmenté suite à l'infection [53]. Évidemment, puisque les lymphocytes T CD4⁺ sont la cellule cible principale du virus, leur nombre diminue pendant l'infection des causes directes du virus. Les lymphocytes T CD4⁺ activés qui sont permissifs à l'infection, subissent un processus d'apoptose alors que les cellules T CD4⁺ quiescentes, qui sont

non-permissives, meurent par un processus inflammatoire appelé *pyroptosis* [56]. Par contre, le compartiment B est également affecté par l'activation chronique du système immunitaire. On observe de fortes concentrations de chimiokines pro-inflammatoires qui affectent le thymus et les cellules progénitrices T et empêchent de bien combler la perte des cellules T [53].

3.5.2. Translocation microbienne

La déplétion des lymphocytes dans le tractus GI et l'endommagement de l'épithélium permettent le passage de composantes bactériennes gastriques vers la périphérie. Ce phénomène s'observe par la présence de produits microbiens tels que les lipopolysaccharides (LPS) dans le sang [5, 53, 54]. Les LPS et autres composants bactériens activent l'immunité innée via les *Toll-like Receptor* (TLR) 4, 2, 5 et 9. La translocation microbienne s'accompagne aussi d'une perte des cellules Th17 CD4⁺. Il est à noter que les cellules Th17 CCR6⁺ sont une cible de choix du VIH-1 [57] dans les muqueuses et importantes pour le maintien du microbiome commensal [53]. Cette perte de l'immunité intestinale contribue à la chronicité de l'activation immunitaire de l'infection au VIH. Notamment, la diminution des cellules Th17 influence l'équilibre entre les Th17 et les cellules T régulatrices (Treg) qui est importante pour une protection contre les pathogènes tout en évitant une réponse immunitaire trop forte. Les cellules Th17 sont aussi impliquées dans le recrutement de neutrophiles et cellules myéloïdes au tractus GI ainsi que pour la régénération des cellules épithéliales. L'appauvrissement important de ces cellules a donc des conséquences sérieuses sur l'état des muqueuses intestinales [58]. L'infection et l'activation immunitaire favorisent le développement des Tregs et diminuent la réponse antivirale permettant au VIH-1 de persister.

3.5.3. Dérégulation des cellules dendritiques

Les DC sont des cellules immunitaires importantes lors de la réponse à une infection par le VIH-1, étant parmi les premières à rencontrer le virus dans les muqueuses. Ces cellules présentatrices d'antigènes exercent un rôle de sentinelles dans les muqueuses et sont prêtes à réagir lors d'une infection. Les deux principales sous-populations de DCs, mDC et pDC, sont affectées différemment par l'infection. Les

mDCs, que l'on retrouve dans le sang, les ganglions et les muqueuses (cellules de Langerhans) sont des cellules présentatrices d'antigènes et participent à la réponse immunitaire T-dépendante et T-indépendante [59]. Ces cellules expriment également des *pattern recognition receptors* (PRR) ce qui leur permet de réagir à une grande variété de pathogènes. De plus, les mDC immatures peuvent être infectées par le VIH et bien que cette infection soit rarement productive, on observe des changements importants chez les mDC pendant l'infection au VIH-1.

La fréquence de mDC est diminuée chez les individus infectés par le VIH-1 et demeure ainsi même suite aux traitements antirétroviraux [46]. Également, leur capacité à répondre à des stimuli est altérée. Les mDCs de ces patients contribuent aussi à la formation de Tregs dans les tissus lymphoïdes [59] et s'accumulent puisque les NK ne sont pas en mesure d'éliminer les mDCs ayant une maturation incomplète. Lors de la phase aiguë de l'infection, la fonction des cellules dendritiques myéloïdes est altérée. Il a été démontré que les mDCs de patients infectés par le VIH-1 répondent moins efficacement à une stimulation via les TLR et que l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par ces cellules est compromise [60]. Le degré de dérégulation varie selon le type de progression de l'infection [46]. Par contre, vers la fin de la phase aiguë, les mDC deviennent hyper-réactifs et contribuent au « cytokine storm » détecté chez les individus infectés. Nous avons démontré dans un suivi longitudinal d'individus infectés par le VIH-1 que les mDCs matures expriment de grandes quantités du facteur de croissance *B Lymphocyte Stimulator* (BLyS/BAFF) à leur surface et une importante augmentation de BLyS/BAFF et autres facteurs de croissance est détectée dans le sang de ces individus [55]. L'impact de BLyS/BAFF sur le compartiment de cellules B est abordé dans la section 2.6.2.

Pendant la phase chronique, on remarque une altération dans la sécrétion d'IL-12 qui est importante notamment pour l'activation des cellules NK ainsi que pour la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en Th1. Les dérégulations du compartiment de cellules dendritiques sont dues à la fois à la présence directe du virus ainsi qu'à des mécanismes indirectes. La translocation microbienne discutée dans la section précédente

a un impact sur l'activation des mDCs. En effet, la présence de LPS a un effet suppressif sur la sécrétion de cytokines incluant IL-12 par les mDCs.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) font un lien entre l'immunité innée et adaptative en interagissant avec une multitude de cellules immunitaires. Les pDCs produisent de l'interféron de type 1 (IFN-1) suite à l'interaction d'ARN simple brin avec TLR7. L'interféron de type 1, notamment IFN- α , induit l'activation et la maturation des pDCs, NK et lymphocytes B créant ainsi un lien entre l'activation immunitaire innée et adaptative [53, 54]. En temps normal, les pDC cessent d'être stimulés par les TLR afin d'éviter la surproduction d'IFN- α . Cependant, dans le contexte du VIH, le phénotype des pDC fait en sorte que ces cellules continuent à produire de l'IFN- α , contribuant ainsi au maintien de l'activation immunitaire.

3.6. Dérégulation du compartiment de lymphocytes B

Une dérégulation des lymphocytes B est observée dès la phase aigüe de l'infection par le VIH-1, résultat de l'activation chronique de ce compartiment de cellules. L'hyperactivation des lymphocytes B est une caractéristique reconnue de l'infection au VIH-1. Cette activation est visible par une hyperglobulinémie, une hausse du renouvellement de ces cellules, une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation tels que CD70, CD71 et CD86. De plus, on observe une plus grande différenciation en plasmablastes et sécrétion d'anticorps. Chez les individus infectés, on observe une augmentation des niveaux d'IgG et d'IgA dans le sérum, particulièrement les IgG₁ et IgG₃ en début d'infection [61]. Enfin, la dérégulation des lymphocytes B s'observe aussi par une variation importante dans les fréquences relatives des différentes populations de cellules B chez les individus infectés.[12, 53, 54, 62]. L'effet de l'infection par le VIH-1 se fait aussi sentir dans les organes lymphoïdes secondaires où l'on observe une hyperplasie des follicules ainsi que des altérations importantes dans la structure des centres germinatifs et des zones marginales de la rate [63]. Le VIH-1 contribue de façon directe et indirecte à la dérégulation du compartiment de cellules B. Il a été suggéré que le VIH-1 puisse lier et activer les lymphocytes B via des molécules telles que CD21 et DC-SIGN mais ce phénomène n'a pas été prouvé *in vivo*. De façon similaire aux DCs, les cellules B exprimant DC-SIGN permettent la *trans* infection des

lymphocytes T [64]. Bien que l'infection des lymphocytes B activés via CD40 soit possible *in vitro* [65], le VIH-1 n'établit pas d'infection productive des cellules B *in vivo* et la liaison par DC-SIGN ou CD21 n'est pas suffisante pour expliquer la dérégulation à grande échelle des cellules B [54]. Tel que mentionné précédemment, les individus infectés par le VIH-1 présentent une augmentation de plasmablastes [66]. Ces plasmablastes, sécrètent des grandes quantités d'IgG, alors que l'isotype principal chez les individus non-infectés ou avirémiques sont les IgA. De plus, les anticorps produits sont rarement spécifiques au VIH-1. Alors que pour d'autres infections virales, la proportion de plasmablastes spécifiques peut atteindre 30% des lymphocytes de la périphérie, pour les infections au VIH-1 moins de 1,5% des plasmablastes produisent des Ig spécifiques [66]. Il est cependant plus difficile d'identifier avec certitude tous les anticorps spécifiques au VIH. Les individus infectés par le VIH-1 sont également prônes au développement de lymphomes. L'apparition de ceux-ci est due à la fois à la réactivation du virus Epstein-Barr lors de l'état immunosuppresseur de l'hôte, à l'augmentation des niveaux de certaines chimiokines et à l'état d'activation chronique décrit précédemment. L'hyper-activation des lymphocytes B s'accompagne de l'expression de l'enzyme *activation-induced cytidine deaminase* (AICDA) impliquée dans la régulation du « class switch » et des hypermutations des immunoglobulines. Cette enzyme est aussi associée au développement de « Non-Hodgkins Lymphoma » identifiés chez les patients VIH-1 positifs [67]. Les causes de l'activation des cellules B dans le contexte du VIH restent à confirmer mais plusieurs facteurs et cytokines ont été proposés tels que l'interféron- α , les interleukines 6 et 10, CD40 ligand et BLYS/BAFF. D'ailleurs, plusieurs de ces facteurs, tels que BLYS/BAFF ont des niveaux sanguins très élevés durant l'infection suggérant certainement une implication potentielle. On propose aussi un rôle de l'IFN- α et des gènes stimulés par l'interféron de type 1 dans l'hyperactivation des cellules immunitaires [54].

Nous avons précédemment démontré que les niveaux d'interleukine-10 (IL-10) dans le plasma sont augmentés chez les individus infectés par le VIH-1 tout au long de l'infection [55]. Également, l'expression d'IL-10 par les lymphocytes B de patients infectés est augmentée par rapport à des contrôles négatifs. Chez les progressions classiques, les populations 'précurseurs' de la zone marginale et transitionnelles

immatures présentent l'augmentation d'IL-10 la plus significative. Il faut aussi noter qu'il n'y a pas de différence entre l'expression d'IL-10 par les contrôleurs élites et par les contrôles non-infectés [34]. De plus, les cellules B une fois activées peuvent contribuer à activer d'autres cellules, soit par des événements de contact et/ou via la production de cytokines pro-inflammatoires. Notamment, les niveaux d'interleukine 7 (IL-7), bien que non-essentiels pour le développement des lymphocytes B, corrélerent avec l'augmentation de la fréquence de lymphocytes B transitionnels immatures dans le sang de patients infectés par le VIH-1. Les niveaux d'IL-7 sont aussi inversement proportionnels au compte de lymphocytes T CD4⁺ [45, 54]. La lymphopénie T CD4⁺ a aussi été identifiée comme cause des changements de fréquence relatives des populations de lymphocytes B [45].

L'infection au VIH-1 cause une diminution d'expression du marqueur CD21, signe d'activation à la surface des lymphocytes B. Nous observons ce phénomène notamment par l'augmentation relative de la population mature activée chez les individus infectés de notre cohorte. Une portion de ces cellules CD21-négatives représente des cellules B épuisées. Ces cellules sont spécifiques au virus mais ne sont plus fonctionnelles suite à la chronicité de l'infection. Ces cellules expriment de hauts niveaux de molécules inhibitrices comme PD1 (programmed cell death 1). Chez les individus infectés par le VIH, une population de lymphocytes B mémoire épuisés a été identifiée par Cooper et collègues qui expriment *Fc-receptor-like-4* (FCRL4), CD20, CD27 et de faibles niveaux de CD21 [68, 69]. Plusieurs autres récepteurs inhibiteurs de cellules B sont aussi exprimés de façon similaire à ce qui est observé sur les lymphocytes T épuisés suite à une infection virale [54, 70]. Ce phénomène est surtout observé chez les cellules B mémoires « tissue-like » lors de la phase de virémie chronique. L'infection au VIH-1 engendre aussi la perte de cellules B mémoires et une diminution de leurs fonctions qui n'est pas rétablie même suite aux traitements. On observe la diminution des taux de cellules mémoires accompagnée par un manque d'anticorps contre la rougeole, les pneumocoques et le tétanos, par exemple [71, 72]. Les anticorps produits par les individus infectés ont aussi une durée de vie plus courte que chez les individus sains [71]. Plusieurs facteurs ont été proposés comme cause de cette perte de mémoire. Par exemple, il est possible que les lymphocytes B mémoires répondent mal à l'activation T-dépendante par les lymphocytes

T CD4⁺. On trouve une fréquence augmentée de lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh) dans les centres germinatifs d'individus infectés par le VIH. Ces cellules ont cependant des fonctions grandement affaiblies et ne peuvent apporter l'aide requise par les cellules B pour la recombinaison isotypique et la différenciation en cellules B mémoires [73]. De plus, des protéines virales peuvent empêcher le *switch* isotypique des lymphocytes B mémoires [72]. En effet, la protéine virale Nef peut être transférée aux lymphocytes B par les macrophages infectés et bloquer le changement de classe isotypique [74]. Nef s'accumule aussi dans les centres germinatifs et a été liée à de plus faibles expressions de facteurs requis pour la différenciation des lymphocytes B du GC. Il a aussi été démontré que les faibles nombres de lymphocytes B mémoires peuvent être dus à une augmentation des taux d'apoptose dans cette population ainsi que par une différenciation accrue en cellules plasmiques [75].

3.6.1. Effets de ART sur le compartiment B

Les bénéfices de ART sur les dérégulations du compartiment B sont controversés. Très peu des conséquences de l'infection sur le compartiment de cellules B peuvent être corrigées et le traitement doit être commencé très tôt après l'infection pour être actif [54]. ART permet cependant d'éliminer certains des effets causés par la virémie. Bien que le traitement puisse résoudre certaines des conséquences de l'infection, il ne semble y avoir aucun effet sur la dérégulation de la population de lymphocytes B mémoires. De façon similaire, l'hyperglobulinémie observée chez les individus infectés par le VIH n'est pas rétablie par ART [45]. Moir et collègues ont démontré que les fréquences relatives des lymphocytes B varient suite à l'initiation des traitements antirétroviraux [76]. Nos propres études longitudinales confirment également ces observations.

Les effets de ART sur le compartiment B sont incomplets et dépendent en grande partie d'un traitement administré tôt après la primo-infection[45].

3.6.2. Production de B_{LyS}/BAFF par les DCs et contribution à la dérégulation du compartiment de lymphocytes B

Dre Johanne Poudrier a étudié un modèle de souris transgénique exprimant les gènes du VIH-1 dans les cellules T CD4⁺. Ces animaux présentaient une importante

atrophie des organes lymphoïdes ainsi qu'une perte des lymphocytes T CD4⁺ en plus de posséder des lymphocytes B hyper-réactifs. Les souris exprimaient également le transgène du VIH dans les DC, conséquence du promoteur CD4C employé. Une diminution des DC des ganglions lymphatiques a été décrite chez les souris matures. Cependant, on observe aussi une hyperplasie de la zone marginale de la rate chez les souris transgéniques où des nombres élevés de DC et lymphocytes B s'accumulent [77]. Des observations similaires sont faites chez la souris transgénique pour BLyS/BAFF, un facteur de croissance pour les cellules B produit par les DC, où l'on note une augmentation des nombres de lymphocytes B ainsi que des centres germinatifs mais une diminution des DC dans la rate. Cette augmentation du nombre de lymphocytes B s'illustre entre autres par une forte représentation de lymphocytes B de la zone marginale [78]. Ces études précédentes chez les souris démontrent que la dérégulation des lymphocytes B est modulée par des facteurs autres que la charge virale et la perte de lymphocytes T CD4⁺. En effet, notre équipe a récemment établi que les DCs myéloïdes de progressseurs rapides et classiques (section 2.3) expriment des niveaux élevés de BLyS/BAFF. Cette augmentation des niveaux de BLyS/BAFF est aussi présente dans le sang de ces patients. Les lymphocytes B transitionnels immatures ainsi que les populations B de la zone marginale sont parmi les plus sensibles aux effets de BLyS/BAFF ce qui contribue à l'hyperplasie observée dans les organes où résident ces cellules [12]. Il est important de noter que les progressseurs lents maintiennent des niveaux normaux de BLyS/BAFF et que ces individus sont en mesure de contrôler la dérégulation des compartiments de cellules B et mDC.

4. Chimioquinas et récepteurs :

Les chimiokines ou cytokines chimiotactiques, sont de petites protéines solubles qui dirigent la migration cellulaire, notamment pour le positionnement de cellules immunitaires [79,80]. Elles jouent un rôle important pour le développement, l'homéostasie et le fonctionnement du système immunitaire. Les chimiokines sont aussi impliquées dans la régulation du contexte inflammatoire ainsi que dans certaines maladies dont le cancer [81-83].

Les chimiokines agissent majoritairement sur les neutrophiles, monocytes, lymphocytes et cellules éosinophiles [81].

4.1. Types de chimiokines

On divise les chimiokines en deux sous-familles primordiales, CC et CXC, selon la présence ou non d'un autre résidu (X) entre les 2 cystéines du bout N-terminal de la protéine. Selon cette nomenclature, les chimiokines sont identifiées par CC ou CXC suivi de L pour ligand puis d'un chiffre correspondant au gène codant *SCY*, pour *small secreted cytokine* [81], par exemple CCL20 ou CXCL13. Les sous-familles CX₃C et C existent aussi.

On sépare également les chimiokines en deux catégories fonctionnelles selon la régulation de leur expression, soit homéostatiques et inflammatoires, bien que la majorité des chimiokines appartiennent aux deux catégories [84, 85].

4.1.1. Homéostatiques

Les chimiokines homéostatiques sont exprimées de manière constitutive dans certains tissus, surtout lymphoïdes où elles assurent la localisation des cellules lymphoïdes pendant la lymphopoïèse, et la surveillance immunitaire. Elles sont importantes pour le développement et le maintien du système immunitaire. Les chimiokines homéostatiques n'influencent généralement pas le mouvement des lymphocytes effecteurs et ne contribuent donc pas au développement des maladies mais assurent le maintien de l'homéostasie [84].

4.1.2. Inflammatoires

Les leucocytes et cellules tissulaires activées aux sites d'inflammation sont responsables de la production de chimiokines inflammatoires. Ces chimiokines participent aux réactions inflammatoires en recrutant des cellules telles que des lymphocytes T et autres leucocytes vers les sites de blessures ou maladie [84, 85]. Contrairement aux chimiokines homéostatiques, la production des chimiokines inflammatoires est induite lors d'atteintes à l'immunité.

4.2. Récepteurs à chimiokines

Les chimiokines se lient aux cellules via un récepteur à chimiokine et la signalisation s'effectue via la protéine G. La superfamille des récepteurs couplés à la protéine G représente le plus gros groupe de récepteurs; ceux-ci sont présents chez tous les eucaryotes [79]. Chez les humains, ces récepteurs sont des protéines traversant 7 fois la membrane cellulaire. L'extrémité N-terminale est extra cellulaire et le bout C-terminal est cytoplasmique [83]. La plupart des chimiokines sont pléiotropiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent avoir plusieurs récepteurs, de même, un récepteur peut également se lier à différentes chimiokines [83]. L'expression de récepteurs par les lymphocytes B est étroitement liée à leur niveau de maturité et change constamment pendant le développement et l'activation de ces cellules [86].

4.3. Mécanisme

Suite à la liaison d'une chimiokine au récepteur transmembranaire, un signal se transmet à la protéine G [82]. Cette protéine qui est trimérique se dissocie en 2 sous-unités, α et $\beta\gamma$ qui activent ensuite divers mécanismes. D'abord, une molécule de GDP couplée à la sous-unité α de la protéine G est phosphorylée pour devenir GTP. Cette énergie est ensuite utilisée par la sous-unité α pour se détacher des sous-unités $\beta\gamma$ (voir figure 3). Chacune des sous-unités peut maintenant activer diverses voies de signalisation mais c'est la sous-unité $\beta\gamma$ qui est responsable de l'action chimiotactique en interagissant avec les canaux d'ions pour activer l'enzyme phosphoinositide-3 kinase (PI3K) [82].

La liaison d'une chimiokine à son récepteur cause son internalisation ce qui résulte en une désensibilisation de la cellule pour cette chimiokine. Une phosphorylation cause le détachement du récepteur de la protéine G et celui-ci interagit ensuite avec la β -arrestine qui contrôle son internalisation en dirigeant le récepteur vers des puits couverts de clathrine. Le récepteur subit une endocytose puis il sera recyclé [82].

Il existe des dizaines de sous unités α , β et γ de sorte que des centaines de combinaisons d'hétérodimères sont possibles. Ainsi, une grande variété de cascades

signalétiques peuvent être activées par la protéine G, notamment, le chimiotactisme, l'adhésion, la prolifération et survie cellulaire pour n'en nommer que quelques-uns.

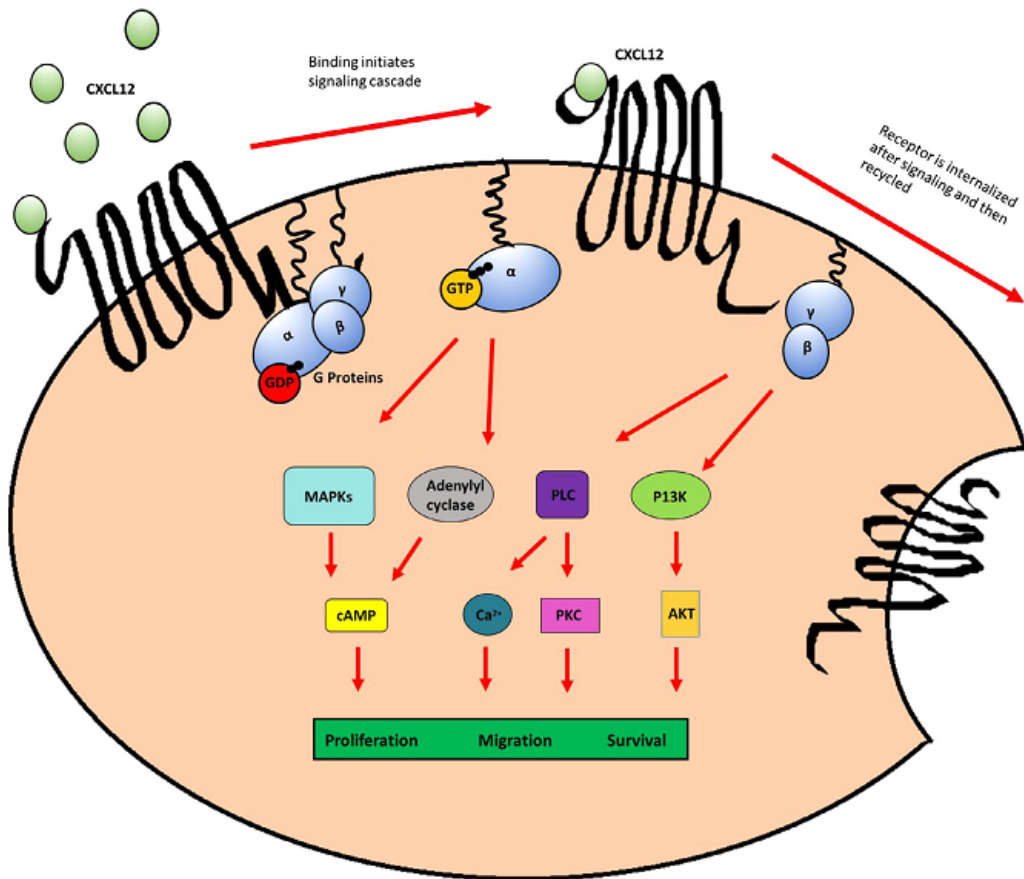


Figure 3. Mécanisme d'activation par les récepteurs couplés à la protéine G. (Tiré de Arnolds, K.L. and J.V. Spencer, *CXCR4: A virus's best friend?* Infection, Genetics and Evolution, 2014. **25**: p. 147) [79]

4.4. Chimiokines et lymphocytes B :

Les lymphocytes B ont la capacité de circuler entre le sang et les organes lymphoïdes en traversant des capillaires par des événements d'adhésion. Dans les organes lymphoïdes, les lymphocytes B, particulièrement les cellules de la MZ, se localisent aux follicules où ils interagissent avec les lymphocytes T pour former des centres germinatifs [84]. C'est à cet endroit que les lymphocytes B prolifèrent.

L'interaction entre les chimiokines et les lymphocytes B est moins bien étudiée que pour les lymphocytes T mais les données actuelles confirment qu'autant les chimiokines homéostatiques qu'inflammatoires peuvent générer une réponse des cellules B [84].

4.5. Les chimiokines et récepteurs sélectionnés pour cette étude :

En se basant à la fois sur la littérature et sur les résultats de nos études précédentes, nous avons sélectionné quatre axes chimiokine-récepteur à étudier dans le cadre de ce projet.

4.5.1. CXCL13 (BCA-1) – CXCR5

Identifiée à la fin des années 1990, la chimiokine CXCL13 ou *B-cell attracting chemokine 1* (BCA-1) est un puissant facteur chimiotactique des cellules B.[84] Cette chimiokine est exprimée de façon constitutive par les cellules dendritiques folliculaires et les cellules stromales dans les follicules de lymphocytes B des organes lymphoïdes secondaires [87, 88]. Elle est également exprimée par les DC immatures (CD1a⁺) [63] ainsi que par certaines cellules B tumorales [89]. Le seul récepteur connu pour CXCL13 est CXCR5 [87, 63]. Son expression est prédominante sur les lymphocytes B du sang et des amygdales ainsi que sur les lymphocytes T CD4⁺ mémoires et Tfh [84]. La production de CXCL13 et l'expression de son récepteur, CXCR5, sont essentielles pour le bon développement des ganglions et des organes lymphoïdes secondaires, notamment, pour l'organisation des centres germinatifs [63]. Cette chimiokine qui attire les cellules aux follicules de la rate, aux ganglions, plaques de Peyer et aux amygdales [90] est également importante pour le passage des cellules B à travers les veinules à endothélium épais des plaques de Peyer [90]. Plusieurs études chez la souris ont également démontré

un lien important entre la lymphotoxine- α (LT- α) et CXCL13 dans le recrutement de cellules aux plaques de Peyer et ganglions lymphatiques [91, 92]. D'autres expériences sur les souris transgéniques CXCR5⁻ démontrent que l'absence de CXCR5 est reliée à une forte augmentation des nombres de lymphocytes B dans le sang périphérique, démontrant l'incapacité de recruter ces cellules vers les follicules [93]. Les souris déficientes en CXCR5 présentent également des nombres réduits de plaques de Peyer et des malformations des follicules [84]. Des malformation des centre germinatifs ont d'ailleurs été observées suite à des infections au VIH ou VIS [63] ainsi que dans des modèles murins. D'ailleurs, les expériences de Cagigi *et al* ont démontré un niveau plus élevé d'ARN messenger CXCL13 chez les patients infectés par le VIH-1 par rapport aux contrôles sains, augmentation que nous avons également détecté dans le sang des patients VIH⁺. L'expression de CXCR5 à la surface cellulaire augmente pendant la maturation des lymphocytes B pour atteindre un niveau d'expression maximal chez les lymphocytes B matures [88]. Une modulation de l'expression de CXCR5 à la surface cellulaire survient suite à son interaction avec le ligand CXCL13 par l'internalisation du récepteur. Puisque les niveaux de CXCL13 sont élevés pendant l'infection, cela peut expliquer la diminution de CXCR5 observée à la surface des cellules [63] .

4.5.2. CXCL12 (SDF-1) – CXCR4/CXCR7

La chimiokine homéostatique CXCL12 ou *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) est un puissant attractant des lymphocytes B, cette chimiokine participe à la localisation et à la rétention des précurseurs de lymphocytes B à la moelle osseuse [84, 94]. CXCL12 fut la première chimiokine à être impliquée dans des fonctions développementales et non-inflammatoires [94]. La chimiokine CXCL12 est exprimée de façon constitutive dans plusieurs autres organes tels que le cœur, le foie, les poumons, les ganglions, le cerveau ainsi que les organes lymphoïdes secondaires [95] et l'épithélium intestinal [96]. L'expression du récepteur CXCR4 contribue aussi au recrutement de cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes à longue durée de vie) à la moelle osseuse [88]. Ce récepteur est exprimé par plusieurs cellules immunitaires dont les monocytes et lymphocytes B ainsi que les lymphocytes T naïfs du sang périphérique. Son impact sur la lymphopoïèse a été bien démontré dans les souris déficientes pour CXCL12 ou pour le récepteur CXCR4.

L'absence de CXCL12 ou CXCR4 empêche la rétention des cellules aux organes lymphoïdes primaires ce qui suggère qu'il n'y a pas de redondance pour cette chimiokine et son récepteur comme c'est le cas pour plusieurs autres [95]. CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont impliqués dans plusieurs cancers et ont été longuement étudiés dans ce contexte. L'interaction CXCL12-CXCR4 a été associée à la migration de cellules cancéreuses vers des sites de métastase [94], notamment, la surexpression de CXCR4 est associée à la dissémination de métastases du cancer du sein [83]. Dans le contexte du VIH, CXCR4 est reconnu comme un co-récepteur du virus à tropisme pour les lymphocytes T [94]. Il a été démontré que CXCL12 est en mesure d'empêcher l'entrée du VIH en bloquant le récepteur CXCR4 [97]. Suite à sa liaison à CXCL12, le récepteur CXCR4 est dimérisé, soit avec un autre CXCR4 ou avec CXCR7, selon l'expression de ce second récepteur sur la cellule. Lors de la liaison de CXCL12 à CXCR4, ce dernier est internalisé et dégradé, désensibilisant ainsi la cellule à CXCL12 [98].

4.5.2.1. CXCR7 – récepteur atypique

Il a récemment été découvert par l'équipe de Balabinian que CXCL12 se lie à un autre récepteur, CXCR7, qui peut former un hétérodimère avec CXCR4 pour activer la protéine G [94, 99]. CXCR7 possède une affinité 10 fois plus élevée pour CXCL12 que CXCR4 [82]. Ce récepteur fait partie d'un sous-groupe de récepteurs à chimiokines atypiques qui n'activent pas la protéine G suite à la liaison de CXCL12. CXCR7 possède une mutation dans la séquence d'acides aminés du domaine de liaison à la protéine G (DRYLSIT au lieu de DRYLAIV) qui pourrait expliquer la différence dans le mécanisme d'activation [83]. La présence de CXCR7 à la surface des cellules immunitaires fut source de controverse suite à son identification mais la communauté scientifique s'entend finalement sur le fait que ce récepteur atypique est bel et bien exprimé par les lymphocytes B humains [83]. L'expression de CXCR7 est aussi inversement proportionnelle à la présence de CXCR4 à la surface d'une même cellule.

CXCR7 est également un récepteur pour la chimiokine CXCL11, aussi connue sous le nom d'*interferon-inducible T-cell α chemoattractant (ITAC)*. Son affinité pour CXCL11 est de 10 à 20 fois inférieure à celle pour CXCL12 [100].

Une des possibilités proposées dans la littérature est que CXCR7 se lie aux ligands CXCL12 et CXCL11 et les internalisent ce qui empêche ceux-ci de se lier à leur récepteurs couplés à une protéine G, soit CXCR4 et CXCR3 respectivement. Ainsi, la cascade d'activation n'a pas lieu [82]. Le ligand internalisé par CXCR7 est dégradé dans des lysosomes, en plus d'empêcher la liaison aux récepteurs typiques, l'élimination de la chimiokine dans le milieu contribue à créer ou maintenir un gradient chimiotactique auquel répond la cellule [83, 98]. Des études récentes suggèrent que CXCR7 serait également capable d'activer les cascades MAP kinase et JAK/STAT3 soit par un mécanisme impliquant une beta-arrestine (phosphorylation de ERK 1/2) ou par sa dimérisation avec CXCR4.

La migration cellulaire dirigée par CXCR4 est guidée par la formation d'un gradient de chimiokine, celui-ci est contrôlé par l'internalisation des récepteurs CXCR7 liés à CXCL12 qui n'activent pas de signalisation intra-cellulaire (ceci s'applique aussi pour CXCL11). L'effet chimiotactique de CXCL12 est bloqué lorsque CXCR4 et CXCR7 sont exprimés sur la même cellule car la formation de l'hétérodimère empêche l'activation de la protéine G. Le mouvement chimiotactique se produit seulement lors de la liaison à un homodimère CXCR4. L'implication de CXCR7 mène au phénomène de *scavenging* qui crée ou maintient un gradient de chimiokines et n'active pas les mêmes voies intracellulaires [82]. Bien que la liaison de CXCL12 à CXCR7 ne génère pas de réponse chimiotactique, la dimérisation de CXCR7 à CXCR4 permet de recruter la β -arrestine de façon plus efficace et contribue à la prolifération cellulaire dans des cas de cancers.

4.5.3. CCL20 (MIP3- α) – CCR6

Le récepteur pour la chimiokine CCL20 a été découvert en 1996 sous le nom de CKR-L3 comme nouveau récepteur couplé à la protéine G. À cette époque, son ligand était inconnu. C'est un an plus tard, grâce au travail de plusieurs équipes que ce récepteur est associé à la chimiokine CCL20 et est rebaptisé CCR6 pour suivre la nomenclature acceptée [101]. CCL20 fut la première chimiokine à être découverte grâce à des analyses bio-informatiques de banques de données d'ADN. Son nom à l'origine était MIP3- α pour *macrophage inflammatory protein 3- α* [85]. CCL20 est exprimé dans les tissus

associés aux muqueuses, particulièrement par les cellules épithéliales du colon [101]. Le récepteur CCR6 est présent sur les cellules immunitaires retrouvées dans cette région ce qui suggère un rôle important pour CCL20 dans le recrutement de cellules dendritiques et les lymphocytes T et B en conditions normales pour maintenir une homéostasie [101]. CCR6 est exprimé de façon constitutive autant dans les organes lymphoïdes que non-lymphoïdes mais en particulier dans les organes lymphoïdes secondaires [101]. On retrouve CCR6 sur les lymphocytes et les cellules dendritiques immatures mais le récepteur est absent des monocytes. Sur un même type cellulaire, l'expression du récepteur est tout de même dépendante du sous-type cellulaire et du niveau de différenciation des leucocytes. Plusieurs s'entendent pour dire que CCL20 est une chimiokine qui peut agir autant de façon homéostatique qu'inflammatoire selon les conditions [85, 101]. CCL20 est exprimé à des niveaux basaux en tout temps et il a été démontré qu'en situations inflammatoires sa production est induite par des facteurs pro-inflammatoires pour attirer les cellules immunitaires aux muqueuses affectées. [85, 101] Certaines sources donnent aussi des propriétés antimicrobiennes à CCL20 [85]. Comme pour plusieurs chimiokines, l'axe CCL20/CCR6 est aussi impliqué dans la formation de métastases du cancer colorectal [102].

4.5.4. CCL25 (TECK) – CCR9

CCL25 ou TECK pour *thymus expressed chemokine*, est une chimiokine exprimée majoritairement par les cellules épithéliales du thymus et du petit intestin et faiblement par les cellules dendritiques du thymus [81, 103]. Cette chimiokine et son récepteur CCR9 ont été identifiés par screening d'ADNc à la fin des années 1990. Dans l'intestin, le gène CCL25 est exprimé partout, alors que l'expression d'ARNm est restreint aux cellules épithéliales des villosités [103]. CCL25 et CCR9 ne sont pas retrouvées dans le colon. Des études chez la souris ont démontré que chez les souris déficientes pour CCR9, le nombre de cellules plasmiques IgA dans les villosités de l'intestin diminue de moitié [104]. De plus, la capacité à générer des IgA spécifiques est sévèrement altérée chez les CCR9-négatifs. CCR9 et CCL25 sont très importants mais non-essentiels pour la production systémique d'anticorps ainsi que pour le recrutement de cellules immunitaires aux muqueuses intestinales [20, 104].

Les muqueuses intestinales sont un site important pour l'entrée de pathogènes dont le VIH-1 et les cellules présentes dans cette région jouent un rôle crucial de première ligne de défense. Notamment, les cellules plasmiques productrices d'anticorps sécrètent des IgA dimériques que l'on retrouve par la suite dans le mucus recouvrant l'épithélium intestinal. Ces anticorps permettent de neutraliser certains des pathogènes entrant par les muqueuses de l'intestin [104]. Nous avons choisi d'inclure l'axe CCL25-CCR9 à notre étude étant donné son implication dans le recrutement de cellules vers cette région.

5. Contexte du projet

5.1. Études chez la souris transgénique

Le projet actuel est la suite logique des études effectuées par Dr Johanne Poudrier sur le rôle des DC dans la dérégulation du compartiment de cellules B chez la souris VIH-transgénique développée par le laboratoire de Dr Jolicoeur. L'étude de modèles murins a permis de mettre l'accent sur l'importance des dérégulations du compartiment de cellules B pour la progression de l'infection au VIH-1. Dans le modèle étudié, le transgène du VIH-1 est exprimé chez la souris par le promoteur humain CD4 et les symptômes dépendent de la molécule virale Nef. On détecte chez les souris infectées une accumulation de lymphocytes B dans les ganglions et la rate ainsi qu'une augmentation de la taille de la zone marginale. De plus, l'activation polyclonale des cellules B décrite chez les humains est également présente. Ces mêmes animaux sont incapables de produire de bonnes réponses T-dépendantes et la capacité de former des centres germinatifs est affaiblie. Lors du croisement de la souris transgénique VIH-1 avec une souris CD3^{-/-}, donc ne possédant pas de lymphocytes T, l'animal résultant développe toujours une maladie semblable au SIDA malgré le fait que les DC sont les principales cellules à exprimer le transgène du VIH. On remarque chez ces souris la même dérégulation des lymphocytes B, notamment des nombres élevés en périphérie ainsi que la production d'anticorps anti-ADN (Poudrier *et al*, non publié). Cette dérégulation du compartiment B semble donc indépendante des dommages aux lymphocytes T. Des similarités entre les souris VIH-transgéniques et le modèle BAFF-transgénique qui surexprime le facteur de croissance BLyS/BAFF ont aussi été mises de l'avant. Ces deux modèles présentent des altérations dans les compartiments de cellules B et DC et la surexpression de

BLyS/BAFF est associée à un élargissement de la MZ[77]. Les souris BAFF-transgéniques présentent aussi une fréquence augmentée de lymphocytes B matures dans le sang ainsi qu'une désorganisation et hypertrophie de la rate et des centres germinatifs [78].

5.2 Études sur les cohortes humaines

Suite au travail effectué sur les modèles de souris, plusieurs des observations ont pu être confirmées chez les humains grâce à l'accès aux cohortes du FRQS-SIDA. Nous avons pu caractériser les compartiments de DC et de cellules B ainsi que mesurer plusieurs molécules inflammatoires et cytokines dans le sang de patients infectés par le VIH-1 chez qui l'infection progresse à différents rythmes. Tel qu'expliqué précédemment, nous pouvons séparer les membres des cohortes en trois catégories de progression clinique, soit les progresseurs rapides chez qui le compte de cellules T CD4⁺ est inférieur à 250 cellules/mm³ en moins de 2 ans d'infection, les progresseurs classiques qui représentent la majorité des cas et qui mettent de huit à dix ans à atteindre le stade SIDA et les progresseurs lents qui maintiennent des niveaux de T CD4⁺ supérieurs à 500 après plus de huit ans d'infection. Ils sont eux-mêmes divisés en porteurs virémiques et avirémiques. Dans chaque groupe de progresseurs, plusieurs prélèvements sanguins et de cellules ont été effectués au cours de l'infection nous permettant de réaliser une étude longitudinale. L'analyse de ce genre de résultats nous offre une source d'information inestimable sur le développement de l'infection chez les différents types de progresseurs.

Les analyses effectuées sur ces cohortes révèlent une augmentation de BLyS/BAFF sécrété à la surface des mDC ainsi que dans le sang des progresseurs rapides et classiques alors que les contrôleurs élités maintiennent un niveau similaire à celui des contrôles négatifs [55]. Des concentrations plasmatiques élevées ont aussi été détectées pour des facteurs de croissance tels que l'IL-10 chez tous les individus infectés [55]. La caractérisation du compartiment de cellule B fut effectuée en employant des techniques de cytométrie en flux. Les populations de cellules B matures activées et précurseurs de la zone marginale sont présentes en plus grandes fréquences chez les progresseurs classiques et rapides que chez les contrôles sains. Fait intéressant, la seule différence significative observée chez les progresseurs lents est une diminution des niveaux de

cellules ‘matures’ de la MZ par rapport aux contrôles non-infectés [34, 55]. Les cellules de la zone marginale nous intéressent particulièrement puisqu’une accumulation de cellules et hypertrophie de cette zone ont été décrites chez les souris présentant une maladie comparable au SIDA.

5.3 Les populations de lymphocytes B étudiées

Cette étude se concentre sur l’expression de récepteurs à chimiokines à la surface des cellules B. Les diverses populations étudiées sont identifiées en utilisant des combinaisons de marqueurs mises au point lors de la détermination des fréquences relatives de ces cellules réalisées précédemment. Nous nous concentrons sur les quatre populations décrites ci-dessous.

5.3.1 Transitionnelles immatures

Enrichies dans le sang de cordon ombilicale et présentes en faibles quantités dans le sang périphérique, les cellules B transitionnelles immatures (TI) sont particulièrement susceptibles aux effets de BLyS/BAFF puisqu’elles sont en cours de maturation [105, 106]. Chez les humains, on définit généralement ces cellules par les marqueurs CD21, CD10⁺, CD39^{hi}, CD44^{lo} [45]. Dans nos études, les cellules B transitionnelles immatures sont CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21⁺CD10⁺. Dès 1987 (revue dans [45]), une fréquence plus élevée de ces cellules est observée dans le sang de patients infectés par le VIH. Nous observons une augmentation non significative de la fréquence de ces cellules dans notre cohorte, particulièrement pour les progressseurs classiques.

5.3.2 Mémoires

L’expression du marqueur CD27 est utilisée pour identifier les cellules B non naïves mémoires. Ces cellules ont rencontré un antigène. En combinaison avec la présence ou non d’Ig à la surface des cellules il est possible de les différencier en lymphocytes B mémoire *switched* et *unswitched* IgM⁺ en fonction de la présence d’Ig ayant ou non subi une commutation de classe [45]. Dans le cas d’une infection au VIH l’activité et la fréquence de ces cellules sont diminuées chez les progressseurs classiques

[34, 54]. Pour les besoins de cette étude, nous définissons les cellules B mémoires au repos comme $CD19^+CD27^+IgM^-CD21^{high}CD10^-$.

5.3.3 Matures activées

On identifie les cellules matures par la présence des marqueurs CD27, CD38 et de faibles niveaux de CD21. Ce sont des cellules ayant rencontré un antigène. Nous définissons les cellules B matures activées comme $CD19^+$, $CD27^+$, IgM^- , $CD21^{low}$ et $CD10^-$. Elles sont retrouvées en plus grande fréquence chez les individus infectés par le VIH.

5.3.4 Cellules B de la zone marginale

Les cellules B dites de la zone marginale ont d'abord été identifiées dans la MZ de la rate chez les rongeurs. La MZ est une niche hétérogène par laquelle les lymphocytes B mémoires T-dépendant peuvent transiter. Le ralentissement de la circulation sanguine à cet endroit permet aux cellules d'entrer en contact avec les antigènes présents dans le sang [22]. Chez les humains, ces cellules sont identifiées par leur expression des marqueurs IgM^{high} , IgD^{low} , CD27, CD21 et CD1c. Les cellules B de la zone marginale représentent une réponse de première ligne importante contre les pathogènes sanguins grâce à leur BCR polyréactif et produisent des anticorps de façon T-indépendante [18, 26]. Ces cellules ont aussi la capacité d'agir de façon T-dépendante en faisant acte de cellule présentatrice d'antigènes pour les cellules T. Elles peuvent aussi transporter des complexes antigènes-complément vers la zone folliculaire pour permettre aux autres types de lymphocytes B d'entrer en contact [26]. Chez l'humain, les cellules B de la MZ expriment des IgM comportant des mutations somatiques qui seraient acquises lors des premières années de vie. Ces cellules peuvent également circuler dans le sang et entre la zone folliculaire et la zone marginale de la rate [18]. Contrairement aux lymphocytes B folliculaires, les cellules B de la MZ ont une longue durée de vie ainsi que la capacité de se renouveler [19]. La capacité des cellules B de la MZ à circuler fait en sorte que l'on retrouve aussi ces cellules dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, les amygdales et la plaques de Peyer du GALT [22]. Dans cette étude, nous considérons deux populations associées à la MZ soit les cellules que nous avons appelées 'précurseurs' de la MZ, identifiées par $CD19^+CD27^+IgM^{high}CD21^{low}CD1c^+$

CD10⁺, et les cellules ‘matures’ de la MZ, CD19⁺CD27⁺IgM^{high}CD21^{high}CD1c⁺CD10⁻. L’étude des cellules humaines de la zone marginale est importante dans le contexte des infections au VIH-1 étant donné leur rôle dans la réponse innée de première ligne et les altérations détectées dans ce compartiment lors d’études murines.

HYPOTHÈSE

Les lymphocytes B sont très importants comme première ligne de défense contre des infections. Notamment, ces cellules immunitaires ont la capacité de produire des anticorps pouvant contrôler un pathogène. Beaucoup d'efforts sont mis aujourd'hui dans la création d'un vaccin contre le VIH-1 mais celui-ci pourra seulement être efficace tant que les cellules B produisant les anticorps sont en santé et fonctionnelles. Hors, la dérégulation du compartiment de cellules B est une caractéristique de l'infection au VIH-1 qui s'observe dès les débuts de l'infection et persiste tout au long de la maladie. Les traitements antirétroviraux sont incapables de complètement corriger les changements qui surviennent dans ces populations. Suite à l'observation longitudinale d'individus infectés par la VIH-1 ayant différents types de progression, nous observons notamment des variations importantes dans la représentation des diverses populations composant le compartiment de cellules B sanguin. Ces variations ainsi que les autres dérégulations des cellules B sont associées à des niveaux élevés de BLyS/BAFF dans le sang des individus virémiques. Ce facteur de croissance produit par les cellules dendritiques encourage la dérégulation des lymphocytes B [55]. Parmi les populations B étudiées, les cellules transitionnelles immatures et de la zone marginale qui constitue des défenses de première ligne sont les plus sensibles aux effets de BLyS/BAFF. Alors que les fréquences de plusieurs populations sont affectées chez les progresseurs rapides et classiques, le seul changement significatif observable chez les progresseurs lent est une diminution de la fréquence des cellules B matures de la zone marginale [34].

Ces observations nous amènent à l'hypothèse que des phénomènes de migration peuvent affecter la localisation des populations de cellules B dans le sang. Cette migration de populations spécifiques semble être affectée par rapport à l'atteinte systémique, l'inflammation et la lymphopénie observées chez les progresseurs rapides et classiques par rapport aux progresseurs lents.

OBJECTIF

Afin de déterminer comment les phénomènes de chimiotactisme affectent le recrutement de cellules B du sang vers d'autres organes, ce projet vise à caractériser la migration des populations B dans le contexte d'une infection au VIH-1. Ceci est effectué en analysant les composantes du mécanisme de chimiotactisme, soit le niveau sanguin de chimiokines et l'expression des récepteurs associés par les différentes populations de lymphocytes B identifiées dans le sang. Nous avons ensuite comparé de façon longitudinale l'expression de récepteurs par les différentes populations et la concentration de chimiokines chez des progressseurs rapides, classiques et lents en portant une attention particulière aux cellules de la zone marginale. Enfin, des tests de migration *in vitro* ont été effectués avec les chimiokines sélectionnées afin d'évaluer directement la migration des différentes populations de cellules B chez les progressseurs et contrôleurs de l'infection au VIH-1.

ARTICLE

Fluctuations in Frequencies of Blood Innate Marginal Zone like B-cell Populations May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status

Julie Gauvin^{1, 2}, Josiane Chagnon-Choquet^{1, 2}, Johanne Poudrier^{1, 2*}, Michel Roger^{1, 2*} and the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Cohorts.

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada, ² Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada.

* JP and MR are senior co-authors

Statut: en préparation

Contributions des co-auteurs: Julie Gauvin a effectué les analyses d'expression des récepteurs par cytométrie en flux, les essais de migration *in vitro* et la quantification de CXCL11. JG a réalisé les analyses statistiques et participé à la rédaction de l'article. Josiane Chagnon-Choquet a participé à la quantification des chimiokines par ELISA et Milliplex et aux analyses statistiques. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration de l'étude, a supervisé les expériences et a participé à la rédaction de l'article. Michel Roger a participé à la rédaction de l'article et a coordonné les différents aspects de l'étude.

Fluctuations in Frequencies of Blood Innate Marginal Zone like B-cell Populations May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status

Julie Gauvin^{1, 2}, Josiane Chagnon-Choquet^{1, 2}, Johanne Poudrier^{1, 2*}, Michel Roger ^{1, 2*} and the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Cohorts.

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada, ² Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada.

*JP and MR are senior co-authors

Word count in text: 3 500

Word count in abstract: 200

Short Title: marginal zone B-cell migration and HIV

Number of figures and tables: Figures 6, Supplementary Figures 2, Table 1.

Reference count: 38

FOOTNOTE PAGE

Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by grants # CHR-126633 and # HB-134180 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

The members of the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups are Mario Legault (coordinator); Jean Pierre Routy (principal investigator Primary HIV Study), Cécile Tremblay (principal investigator Slow Progressor Study), Réjean Thomas, Benoit Trottier, Sylvie Vézina, Louise Charest, Catherine Milne, Jason Friedman, Emmanuelle Huchet (Clinique médicale l'Actuel), Jean-Guy Baril, Pierre Côté, Bernard Lessard, Serge Dufresne, Marc-André Charron (Clinique médicale du Quartier Latin), Roger LeBlanc (Clinique médicale urbaine OPUS), Louise Labrecque, Danielle Rouleau, Claude Fortin, Marie Munoz, Julie Bruneau (UHRESS CHUM), Norbert Gilmore, Richard Lalonde, Martin Potter, Marina Klein, Alexandra de Pokomandy, Jason Szabo, Nicole Bernard (UHRESS-CUSM).

Address correspondence to:

Johanne Poudrier PhD ([REDACTED]) and Michel Roger MD PhD ([REDACTED]), CRCHUM, Tour Viger 900 rue St-Denis, Montréal, Canada H2X 0A9. Phone: [REDACTED] Fax: [REDACTED].

ABSTRACT

Background: HIV-1-infected rapid and classic progressors present increased relative frequencies of blood innate “precursor” marginal zone (MZ)-like B-cells. Although these cells remain unaltered in elite-controllers (EC), percentages of more mature MZ-like B-cells are decreased in the blood of these individuals. Fluctuations in frequencies of blood MZ-like B-cell populations may reflect migratory patterns associated with disease progression status, suggesting an important role for these cells in HIV-1 pathogenesis.

Methods: We have longitudinally measured plasma levels of B-tropic chemokines by ELISA-based technology as well as their ligands by flow-cytometry on blood B-cell populations of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression and uninfected controls. Migration patterns of B-cell populations from these individuals were determined by chemotaxis assays. **Results:** We found important modulations of CXCL13-CXCR5, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL20-CCR6 and CCL25-CCR9 chemokine-axes and increased cell migration patterns in rapid and classic progressors. Interestingly, frequencies of CCR6 expressing cells were significantly elevated within the precursor MZ-like population, consistent with increased migration in response to CCL20 gradient. Although we found little modulation of chemokine-axes in EC, cell migration was greater than that observed for classic progressors, especially for mature MZ-like B-cells. **Conclusions:** Control of HIV-1-disease progression may involve recruitment of mature MZ-like B-cells to peripheral sites.

Word Count in ABSTRACT: 200

Key Words: HIV infection, disease control vs progression, B-cells, innate marginal zone B-cells, B-tropic chemokine-axes, migration.

INTRODUCTION

Promising vaccine strategies as well as studies with individuals presenting natural immunity have highlighted the importance of B-cells in the battle against HIV [1]. An efficient response likely involves orchestration of first-line reactions from innate

populations in conjunction with matured high affinity responses from adaptive B-cells. These cells are expected to operate at peripheral mucosal sites, which are ports of entry and perpetuation for the virus. Understanding the nature and how B-cell populations are recruited and maintained within mucosal niche [2, 3] to facilitate or control HIV-1 disease progression is important to the design of effective preventive/therapeutic approaches.

The B-cell compartment is impeded in the majority of HIV-infected individuals early on, throughout the infection, and not fully restored by therapy [4, 5]. Despite a reduction in total B-cells, we have observed augmented frequencies of a population presenting features shared by both transitional immature (TI) and innate-like marginal zone (MZ) B-cells, designated as “precursor” MZ-like, in the blood of HIV-1-infected rapid and classic progressors [6, 7]. Most importantly, in aviremic slow progressors also referred as elite controllers (EC), precursor MZ-like B-cell frequencies remained unaltered. Rather, percentages of MZ-like B-cells presenting a more “mature” profile were decreased when compared to rapid and classic progressors, as well as HIV-negative individuals. These findings are in line with growing evidence suggesting that innate-like B-cell responses are involved in the battle against HIV [8].

In an effort to further understand the differences in blood B-cell population dynamics associated with disease progression vs control, we have assessed whether the chemokine-ligand(s) axes presenting B-cell tropic potential towards peripheral lymphoid and mucosal sites such as CXCL13-CXCR5, CXCL12-CXCR4/CXCR7, CCL20-CCR6 and CCL25-CCR9 [9], may impact on blood B lymphocyte levels and population frequencies.

METHODS

Subjects

Thirty-one individuals from the Montreal Primary HIV-1 Infection cohort were selected and divided into 13 rapid and 18 classic progressors based on their blood CD4⁺ T-cell counts. The date of infection was estimated using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program (NIAID, Bethesda, MD). Rapid progressors had blood CD4⁺ T-cell counts below 250 cells/mm³ within 2 years of

infection. Blood samples were taken in acute (0-3 months) and/or early (5-8 months) phases of infection, and 3-6 and 9-12 months after initiation of antiretroviral therapy (ART). Classic progressors were ART-naïve individuals whose blood CD4⁺ T-cell counts remained above 500 cells/mm³ for the 2 year follow-up. Blood samples were obtained in the acute, early and chronic (24 months) phases of infection. Blood samples from 12 slow progressors (6 viremic: low detectable viral load, and 6 aviremic: undetectable viral load) were obtained from the Montreal Slow Progressors cohort. These are patients with CD4⁺ T-cell counts that remain above 500 cells/mm³ after being infected for 8 years or more. Lastly, blood samples were obtained from 17 age- and sex-matched HIV-negative controls. Written informed consent was obtained from all subjects, and research conformed to guidelines and was approved by the CRCHUM Ethics Review board (project #SL05.028).

HIV plasma viral loads were determined with the Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Blood CD4⁺ T-cell counts were assessed as reported [10]. The subjects were cleared of co-infections with syphilis and hepatitis B or C.

Characterization of chemokine receptor expression by blood B-cells

Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were processed for multi-color flow-cytometry as reported [6, 7]. We used Aqua-LIVE/DEAD exclusion Fixable Stain (Invitrogen/Life technologies, Eugene, OR). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to characterize B-cell populations as described [6, 7], and their chemokine receptor expression patterns: PacificBlue-anti-CD19, APC-Cy7-anti-CD10, AlexaFluor647-anti-CCR9 (BioLegend, San Diego, CA); AlexaFluor700-anti-CD27, FITC-anti-IgM, PE-anti-CD21, APC-anti-CXCR4 (BD-Biosciences); PerCP-eFluor710-anti-CD1c, PE-Cy7-anti-CCR6 (eBioscience, San-Diego, CA); APC-anti-CXCR7 (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA). Biotinylated rat anti-human-CXCR5 (BD-Biosciences) was used. Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde overnight prior to analysis. Data acquisition of 105 events per sample

was performed with LSRFortessa (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR). All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) and Anti-Rat Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRFortessa, respectively.

Evaluation of plasma chemokine concentrations

Levels of CXCL11 (RayBiotech, GA), CCL25 and CCL20 (R&D Systems, MN) were determined using commercial ELISA Kits. Levels of CXCL12 and CXCL13 were measured using the Milliplex Human Cytokine/Chemokine Kit (Millipore, MA).

Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were performed as described [11]. Briefly, B-cells were negatively enriched from PBMCs of subjects randomly selected from the HIV-uninfected (n=3), HIV-infected classic progressor (n=3) and aviremic slow progressor/EC (n=3) groups using immunomagnetic-based technology (Dynabeads, Dynal-Invitrogen/Life Technologies). CD19+, CD14-, CD56-, CD3- and CD11c- staining ensured >95% purity of B-cells. 1.5×10^5 B-cells were allowed to migrate through 5 μ m pore-size filters of transwell inserts (Corning, NY) for 3 hours at 37°C in response to either of medium alone or human recombinant CXCL13 (500ng/ml) [11], CXCL12 (250 ng/ml) [11], CCL20 (10 ng/ml) [12] and CCL25 (100 ng/ml) [13] (RayBiothech). Due to limitations in cellular yields, we used fixed chemokine concentrations as described [11–13]. Migrated cells were collected, stained and counted by flow-cytometry for 2 minutes. B-cell populations were analyzed as stated above. Wilcoxon paired T-test showed significant difference (p-value= 0.0033) in the viability of migrated (64.6%) and un-migrated (56.4%) B-cells after 3 hours, invariably of chemokine exposure. Migration is presented as an index of migrated cells towards each chemokine divided by the spontaneous migration of each sample, as described [14].

Statistical analyses

The statistical significance of differences between groups was assessed with Fisher exact test for categorical variables and unpaired Student t test when continuous variables were normally distributed or with Mann-Whitney U test otherwise. Wilcoxon signed rank test was used for pairwise comparisons of different phases of infection within each group. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

RESULTS

Socio-demographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals are shown in Table 1, and longitudinal assessment of blood CD4+ T-cell counts and viral loads are depicted in Supplementary Figure 1. There were no significant correlations between blood CD4+ T-cell counts or viral loads and B-cell populations, chemokine plasma levels or chemokine receptor expression, either within groups or among all subjects during early or chronic infection (data not shown).

Longitudinal measurements of CXCL13 plasma levels and CXCR5 expression by blood B-cells of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

The implication of CXC chemokine ligand 13 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are well-documented in B-cell homeostasis and migration to lymphoid follicles. In fact, CXCL13 is essential for normal lymph node development [15]. Our findings show elevated levels of plasma CXCL13 as soon as in the acute phase and throughout the course of infection in all viremic patients (Figure 1A). CXCL13 levels in aviremic slow progressors/EC were slightly above those observed in HIV-negative controls (Figure 1A, right panel). Expression of chemokine receptors was assessed based on the strategy of

flow-cytometry analysis depicted in Supplementary Figure 2. There were significant decreases in frequencies of total as well as mature activated (CD19+CD27+IgM-CD21loCD10-CD1c-) B-cells expressing CXCR5 in the blood of both rapid and classic progressors for most time-points, throughout follow-up and despite therapy. Levels of CXCR5 expression were also significantly reduced on total and mature activated B-cell populations in these individuals (Figure 1B, C left and middle panels). Interestingly, slow progressors showed no significant difference in the percentage of CXCR5 expressing total or mature activated B-cells when compared to HIV-negative controls, although CXCR5 expression levels were significantly reduced (Figure 1B, C right panels). As for resting switched memory B-cells (CD19+CD27+IgM-CD21hiCD10-), CXCR5 expression levels were significantly decreased at most time-points for all HIV-1-infected subjects in comparison to HIV-negative controls (Figure 1D). Interestingly, the frequencies of CXCR5 expressing precursor (CD19+CD27+IgMhiCD21loCD1c+CD10+) and mature MZ-like (CD19+CD27+IgMhiCD21hiCD1c+CD10-) populations remained unaltered during the course of infection in all HIV-1-infected individuals (Figure 1E, F). However, levels of CXCR5 expression on mature MZ-like B-cells were significantly lower in all viremic HIV-infected patients when compared to those observed in HIV-negative controls (Figure 1F). The frequencies of CXCR5 expressing TI (CD19+CD27-IgM+CD21+CD10+) B-cells were lower at the 0-3 month time-point for rapid and classic progressors in comparison to HIV-negative controls (Figure 1G) and no changes were observed regarding expression levels (Figure 1G). Aviremic slow progressors/EC had the highest in vitro migration indexes in response to CXCL13 when compared to classic progressors and HIV-negative controls (Figure 6a). Overall, the most important difference between HIV-1-uninfected and -infected individuals, regardless of disease progression type is observed in the more mature B-cell populations, such as mature activated, resting switched memory and mature MZ-like, where cells express significantly less CXCR5 than the HIV-1 negative controls. This could reflect a response to the increased CXCL13 plasma levels at the same time-points.

Longitudinal measurements of CXCL12 plasma levels and CXCR4 expression by blood B-cells of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

CXCL12 is a chemokine constitutively expressed in many organs and is important for the recruitment and retention of B-cells in the bone marrow [16]. Plasma CXCL12 levels were decreased in the acute phase of infection for both rapid and classic progressors, and subsequently increased in the chronic phase (Figure 2A left and middle panels). CXCL12 levels in slow progressors were similar to those observed in HIV-negative controls (Figure 2A right panel). CXCR4 was expressed by the majority of blood B-cell populations analyzed. Both the levels of expression and frequencies of CXCR4 expressing cells were reduced for all B-cell populations in HIV-1-infected rapid and classic progressors when compared to HIV-negative controls (Figure 2B-G). As for slow progressors, percentages of CXCR4 expressing B-cells were similar to that of HIV-negative controls (Figure 2B, C, right panels). CXCR4 expression levels in viremic slow progressors were significantly reduced in most B-cell populations analyzed when compared to aviremic slow progressors/EC and HIV-negative controls (Figure 2B-G right panels). Overall, the modulation of CXCL12 and CXCR4 was most evident in rapid progressors whereas aviremic slow progressors/EC were least affected.

Aviremic slow progressors/EC had higher in vitro migration indexes in response to CXCL12 for mature MZ-like, precursor MZ-like and switched memory B-cells when compared to classic progressors and HIV-negative controls (Figure 6B).

Longitudinal measurements of CXCL11 plasma levels and CXCR7 expression by blood B-cells of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

Among its many functions, chemokine receptor CXCR7 acts as a scavenger to control the levels of CXCL12 available for CXCR4 [15]. Thus, we measured the expression of CXCR7 as well as the levels of its other ligand, CXCL11. Importantly, it has been shown that CXCR7 binds to CXCL12 with higher affinity than CXCR4 [15]. The levels of

CXCL11 in the plasma of all HIV-1-infected individuals were similar to those of HIV-negative controls (Figure 3A).

CXCR7 was not greatly expressed by total blood B-cells of HIV-negative controls, but its expression seemed to be favoured by the precursor MZ-like population (Figure 3B-G). In rapid progressors, the levels of expression and frequencies of CXCR7 expressing B-cells were not significantly altered when compared to HIV-negative controls (Figure 3B-G left panels). However, in classic progressors, we found that the percentages of CXCR7 expressing cells were significantly increased when compared to HIV-negative controls at all time-points for total and all B-cell populations analyzed (Figure 3B-G middle panels). We found no significant changes for CXCR7 expression levels except for resting switched memory B-cells (Figure 3D middle panel). Importantly, we found that the frequencies of CXCR7 expressing B-cells were significantly higher in slow progressors when compared to HIV-negative controls, for all populations except precursor MZ-like (Figure 3B-G, right panels). CXCR7 expression levels were significantly lower on total B-cells (Figure 3B right panel), and had a strong tendency to be lower for most populations (Figure 3B-G right panels). The fact that frequencies of CXCR7 expressing B-cells were significantly increased within most populations analyzed in aviremic slow progressors/EC likely reflects an effort to maintain the integrity of the CXCL12-CXCR4 axis in these individuals.

Longitudinal measurements of CCL20 plasma levels and CCR6 expression by blood B-cells of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

Since HIV infection tend to involve mucosal sites, both for virus entry and propagation/perpetuation, we also looked at the CCL20/CCR6 chemokine-receptor pair [17]. Plasma CCL20 levels were significantly increased at all time-points for all viremic subjects when compared to HIV-negative controls (Figure 4A).

CCR6 was expressed by a relatively small percentage of total blood B-cells of HIV-negative individuals, and among the populations analyzed, we found more CCR6 expressing cells within the precursor and mature MZ-like, as well as TI B-cells (Figure

4B-G). We found that for rapid and classic progressors, the frequencies of CCR6 expressing cells were higher than normal at most time-points, for these and most B-cell populations analyzed (Figure 4B-G left and middle panels). However, levels of CCR6 expression were not significantly affected in these individuals apart from a tendency to be lower on TI B-cells (Figure 4E-G left panels). We found no significant changes in frequencies of CCR6 expressing cells or levels of expression in all B-cell populations in slow progressors when compared to HIV-negative controls (Figure 4B-G right panels). However, upon assessment of B-cell migration potential towards CCL20 (Figure 6C), aviremic slow progressors/EC showed the highest migration index for total and mature MZ-like B-cells, whereas classic progressors had the highest migration index for the precursor MZ-like and TI populations. Generally, the increased levels of CCL20 in the plasma of rapid and classic progressors were accompanied by higher frequencies of cells expressing CCR6 with the exception of the mature activated B-cell population in which very few cells expressed the receptor.

Longitudinal measurements of CCL25 plasma levels and CCR9 expression by blood B-cells of HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression

Plasma CCL25 levels were modulated at later time-points following infection, and were increased during ART for rapid progressors, and at 5-8 and 24 month PI for classic progressors, whereas slow progressors showed no difference when compared to HIV-negative controls (Figure 5A). We found a heterogeneous distribution of blood frequencies of CCR9 expressing B-cells in the HIV-negative group, for most populations analyzed with the exception of precursor MZ-like B-cells, which majority expressed CCR9 (Figure 5B-G). No significant change in the frequency of CCR9 expressing cells was seen in any of the populations analyzed for rapid progressors when compared to HIV-negative controls, although we found increased CCR9 expression levels by mature activated cells (Figure 5B-G left panels). Classic progressors and slow progressors had significantly increased frequencies of CCR9 expressing mature activated and resting switched memory B-cells when compared to HIV-negative controls (Figure 5C, D middle and right panels). Moreover, CCR9 expression levels tended to be lower on B-cell

populations in these individuals, especially for switched memory as well as precursor and mature MZ-like B-cells (Figure 5D-F right panels). Interestingly, these latter B-cell populations presented the greatest migration index in response to CCL25 in aviremic slow progressors/EC when compared to classic progressors and HIV-negative controls (Figure 6D).

DISCUSSION

Consistent with reduced total B-cells and altered population frequencies [6,7], B-tropic chemokine-axes were strongly modulated in the blood of HIV-1-infected rapid and classic progressors. This could be reflecting drainage to peripheral sites and likely has an impact on activation, exhaustion and cell turnover; as well as altered regulation of cell influx [4, 5, 18]. Furthermore, we find B-cells from classic progressors had higher migration indexes than HIV-negative controls. These findings are consistent with those reported by Cagigi et al, whereby the increased CXCL13 and concomitant decreased expression of CXCR5 did not affect in vitro B-cell migration potential, which was augmented in HIV-infected individuals with low CD4+ T-cell counts. Altogether, these observations are in line with the overwhelming burden and inflammatory status associated with disease progression as well as the high BLyS/BAFF [6] and B-cell IL-10 expression levels [7] we described for viremic HIV-infected individuals, and consistent with the notion that activated cells are more responsive to in vitro chemotaxis [19].

Importantly, we found a modest modulation of chemokine-axes in the blood of aviremic slow progressors/EC, which is consistent with their lower inflammatory, BLyS/BAFF and IL-10 expression profile [6,7]. Interestingly, for these individuals, most in vitro migration patterns in response to B-cell tropic chemokines were greater or comparable to that observed for classic progressors. As such, B-cells from aviremic slow progressors/EC may present receptors less saturated or desensitized by chemokines and other possible ligands. Nevertheless, the mechanisms responsible for differential migratory capacities are complex and may be modulated in vivo and deserve to be further elucidated.

Lymphoid organization is severely altered over the course of HIV-1 infection [14]. Here we show that CXCL13 was elevated in the plasma of HIV-1-infected individuals with detectable viremia, early on and despite successful ART. The most important difference between HIV-1-infected and -uninfected individuals, regardless of disease progression type, was observed in the more mature B-cell populations, where cells expressed significantly less CXCR5 than the HIV-negative controls, likely reflecting response to CXCL13 plasma levels at the same time-points, as CXCR5 is known to internalize after contact with its ligand [14]. Modulation of the CXCL13-CXCR5 axis has been previously observed in chronic HIV-1-infected individuals [20] as well as in SIV-infected non-human primates [21] and supports drainage of B-cells to the follicles of lymphoid tissues. This is in agreement with the increased number of follicles as well as B-cell hyperplasia seen in the context of SIV/HIV infections [22] and is reminiscent of that we observed in HIV-transgenic mice [23, 24]. Increased CXCL13 is also likely to influence positioning within the lymphoid organ, as well migration to germinal centers [21]. Studies have shown the importance of Lymphotoxin- α in the organization and maintenance of lymphoid structures, as well as in the modulation of immune responses [25], through a process involving a CXCL13 feedback loop [26]. As such, the aviremic slow progressors/EC studied herein had increased frequencies of MZ-like B-cells expressing Lymphotoxin- α when compared to rapid and classic progressors [7], and this may help explain their lower CXCL13 levels and likely a certain lymphoid homeostasis/integrity.

CXCL12 is constitutively expressed in many organs including the normal intestinal epithelium where it contributes to migration and maintenance of barrier integrity [18]. Furthermore, it has recently been found to be modulated in several inflammatory and autoimmune processes [18]. Consistently, we found that the CXCL12-CXCR4 axis was mostly affected in rapid progressors, who presented disrupted mucosal integrity as indicated by elevated plasma LPS and LBP levels [6]. However, we found no significant change in CXCR7 expression in these individuals. Among its many functions, CXCR7 acts as a scavenger and controls the levels of CXCL12 available for CXCR4. It promotes homeostatic and inflammatory migration as well as anti-apoptotic and survival signalling [15, 27]. Although we found little modulation of chemotaxis-axes in aviremic slow

progressors/EC, their modulation of CXCR7 expression may be advantageous in preserving a seemingly normal CXCL12-CXCR4 axis, as well as mucosal integrity [6]. Of note, CXCR7 expression was higher on ‘precursor’ MZ-like B cells for all subjects including HIV-negative individuals. This is in agreement with a recent publication suggesting CXCR7’s involvement in MZ retention [28]. Furthermore, CXCR7 has been reported in gene expression array analyses of mouse and human MZ B-cells [29].

HIV infection majorly involves mucosal sites, both for entry and propagation/perpetuation [30]. We found that CCL20 was increased in plasma early on for rapid and classic progressors, and persisted beyond ART. This is consistent with previous studies showing increased CCL20 in the context of inflammation [17, 31]. Moreover in these individuals, the frequencies of CCR6 expressing cells were significantly higher than normal at all time-points, for most populations analyzed, especially precursor and mature MZ-like as well as TI B-cells, which mostly expressed CCR6 in HIV-negative controls. Importantly, we found no significant changes in frequencies of CCR6 expressing cells or levels of expression in either total blood B-cells or populations of interest for either viremic or aviremic slow progressors/EC when compared to HIV-negative controls. Suggesting a certain degree of integrity/homeostasis of peripheral mucosal B-cell responses in these individuals. We found classic progressors had the highest migration index for the precursor MZ-like and TI populations whereas aviremic slow progressors/EC showed the highest migration index for mature MZ-like B-cells. These observations suggest high turnover and peripheral drainage of precursor MZ B-cells in the context of HIV-disease progression, whereas recruitment of mature MZ might be more advantageous to control of disease progression.

Surprisingly, we found CCL25 was only elevated during the chronic phase or following ART for the rapid and classic progressors. We would have expected this chemokine to be elevated at earlier time-points in order to attract cells to the area most affected by HIV infection. An important accumulation of B-cells has been shown in the gut of SIV-infected macaques [32, 33], it is therefore likely that this phenomenon is true in humans as well. It is possible that gut homing may be affected and/or fulfilled through different mechanisms/migratory axes. Of note, we found that levels of retinoic acid in the plasma

of rapid progressors were significantly decreased early on following infection when compared to uninfected donors, and these were increased only following ART [34]. Intriguingly, we noticed that the frequency of CCR9 expressing cells is around 80% for most B-cell populations in the slow progressors when compared to the other study groups (Figure 5B-G). This of course could be in link with the smaller sample size, but could also suggest an advantage and/or consequence of chronicity and slow disease progression. Interestingly, switched memory as well as precursor and mature MZ-like B-cells presented the greatest migration index in response to CCL25 in aviremic slow progressors/EC when compared to classic progressors and uninfected controls. Suggesting the capacity to migrate to the gut is favoured in EC.

BLyS/BAFF is known to highly influence cell fate decision towards the MZ B-cell pool [35, 36], and our previous studies suggest the BLyS/BAFF expression profile encountered in HIV-infected progressors vs controllers may impact on MZ-like B-cell population dynamics and activation status [37]. Despite the fact that precursor MZ-like B-cells represent only a small fraction of circulating B-cells, their increased relative frequencies in the blood of rapid and classic progressors in the context of high BLyS/BAFF, and recruitment to periphery may significantly influence disease progression through over-representation of polyclonal at the expense of refined responses with potent eradicated properties. Furthermore, MZ B-cells set the stage for germinal center reactions [38], and their alteration is likely to impede on B-cell immunity. In aviremic slow progressors/EC, the decreased relative frequencies of mature MZ-like B-cells was associated with a migration index greater than those of classic progressors or uninfected controls in response to CXCL13, CXCL12, CCL20 and CCL25. Suggesting that the capacity to recruit this population to peripheral sites may be beneficial to the “control” of disease progression.

CONCLUSION

The mechanisms involved in the control of HIV-1 disease progression and maintenance of a certain degree of immune integrity are likely to require regulated trafficking, and

possibly recruitment of populations such as mature MZ-like B-cells to peripheral and mucosal sites. Efficiently soliciting such populations may be borne in mind in the design of vaccine strategies aiming at generating both first-line/innate and adaptive protective responses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the participants of the Montreal PHI and Slow Progressors study groups. We thank Drs Dominique Gauchat, Paméla Thebault and Laïla-Aïcha Hanafi for invaluable flow-cytometry expertise and Marc-André Lecuyer for help with the migration assay. Marie-Pierre Boisvert, Maryse Lainesse, Rebecca Bordi, Véronique Lafontaine, Bader Yassine-Diab and Younes Chouick for processing the blood samples.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS JG and JCC performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

REFERENCES

1. Poudrier, J., V. Thibodeau, and M. Roger, Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol*, 2012. 875821.
2. Macpherson, A. and K. McCoy, Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Seminars in Immunology*, 2013. 25(5): p. 358-363.
3. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A. Macpherson, Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012. 336(6086): p. 1268-1273.
4. Moir, S. and A.S. Fauci, B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews - Immunology*, 2009. 9: p. 11.
5. Poudrier, J., J. Chagnon-Choquet, and M. Roger, Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol*, 2012. 592187.
6. Fontaine, J., et al., High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *blood*, 2011. 117(1).
7. Chagnon-Choquet, J., et al., IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS ONE*, 2014. 9(7): p. e101949.
8. Borrow, P., Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2011. 6(5): p. 353-363.
9. Zlotnik, A. and O. Yoshie, The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 2012. 36: p. 705-716.
10. Mercier, F., et al., Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Clin Exp Immunol.*, 2008. 152(1): p. 72-80.

11. Badr, G., et al., BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood*, 2008. 111: p. 2744-2754.
12. Marsigliante, S., C. Vetrungo, and A. Muscella, CCL20 induces migration and proliferation on breast epithelial cells. *Journal of Cell Physiology*, 2013. 228(9): p. 1873-1883.
13. Johnson, E., et al., CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion *World Journal of Surgical Oncology*, 2010. 8(62).
14. Cagigi, A., et al., Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *blood*, 2008. 112(12).
15. Naumann, U., et al., CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*, 2010. 5(2).
16. Cyster, J.G., Homing of antibody secreting cells. *Immunological Reviews*, 2003. 194: p. 48-60.
17. Williams, I.R., CCR6 and CCL20 Partners in Intestinal Immunity and Lymphorganogenesis. *Annals New York Academy of Sciences*, 2006. 1072: p. 52-61.
18. Werner, L., H. Guzner-Gur, and I. Dotan, Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 interactions in inflammatory bowel disease. *Theranostics*, 2013. 3(1): p. 40-46.
19. Brandes, M., et al., Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines. *International Immunology*, 2000. 12(9): p. 8.
20. Widney, D.P., et al., Serum Levels of the Homeostatic B Cell Chemokine, CXCL13, Are Elevated During HIV Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005. 25.
21. Reinhart, T.A., S. Qin, and Y. Sui, Multiple Roles for Chemokines in the Pathogenesis of SIV Infection. *Current HIV Research*, 2009. 7(1): p. 73-82.

22. Moir, S. and A.S. Fauci, Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunological Reviews*, 2013. 254: p. 18.
23. Hanna, Z., et al., Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *Journal of Virology*, 1998. 72(1): p. 121-132.
24. Poudrier, J., et al., The AIDS Disease of CD4c/HIV Transgenic Mice Shows Impaired Germinal Centers and Autoantibodies and Develops in the Absence of IFN- γ and IL-6. *Immunity*, 2001. 15(2): p. 173-185.
25. Calmon-Hamaty, F., et al., Lymphotoxin a revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2011. 13(4): p. 232.
26. Ansel, K.M., et al., A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*, 2000. 406: p. 309-314.
27. Sanchez-Martin, L., P. Sanchez-Mateos, and C. Cabanas, CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2013. 19(1): p. 10.
28. Wang, H., et al., The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *blood*, 2012. 19(2).
29. Berahovich, R.D., et al., Differences in CXCR7 protein expression on rat versus mouse and human splenic marginal zone B cells. *Immunology Letters*, 2013. 154: p. 77-79.
30. Brenchley, J., Mucosal immunity in human and simian immunodeficiency lentivirus infections. *Mucosal Immunology*, 2013. 6(4): p. 657-665.
31. Schutyser, E., S. Struyf, and J.V. Damme, The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003. 14.
32. Chaoul, N., et al., Default in plasma and intestinal IgA responses during acute infection by simian immunodeficiency virus. *Retrovirology*, 2012. 9(1): p. 43.

33. Peruchon, S., et al., Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acut SIV infection. PLoS ONE, 2009. 4(6): p. e5966.
34. Chagnon-Choquet, J., et al., HIV Nef promotes BLyS/BAFF expression by blood dendritic cells during the course of infection in humans. J Infect Dis, 2014.
35. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. Nature Reviews - Immunology, 2013. 13: p. 15.
36. Weill, J.-C., S. Weller, and C.-A. Reynaud, Human Marginal Zone B-cells. Annual Review of Immunology, 2009. 27: p. 21.
37. Poudrier, J. and M. Roger, Dendritic cell status modulates the outcome of HIV-related B cell disease progression. PLoS Pathogens, 2011. 7(8): p. e1002154.
38. Victora, G., Germinal centers. Annual Review of Immunology, 2012(30): p. 429-457.

Table 1: Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-1 infected individuals

	Rapid progressors	Classic progressors	Viremic Slow Progressors	Aviremic Slow Progressors	p
Characteristics	(n=13)	(n=17)	(n=7)	n=6)	
Age at first visit	34±7	38±8	46±7	44±11	0.005 ¹
sex (male/female)	12/1	17/0	7/0	3/3	0.0025
Race (Caucasian/other)	12/2	16/1	6/1	5/1	ns
Route of transmission	8 MSM, 3 HS, 1IDU	16 MSM, 1 IDU	7 MSM	3 MSM 3 HS	0.045
CD4⁺ T cell count (cells/mm³)					
Acute phase	533±140	781±213	na	na	0.002
Early phase	446±146	714±186	na	na	0.0008
Chronic phase	400±152	629±244	562±122	888±122	0.011 ²
Nadir	255±118	431±141	506±129	506±175	0.0005 ³
Viral load (x 10³)					
Acute phase	366±705	76,2±126	na	na	NS
Early phase	121±186	71,2±108	na	na	NS
Chronic phase	7,65±15	37,7±62	3,01±1,9	<0.05 ⁴	0.003 ⁵
Peak	570±808	202±236	8,47±6,46	0,06±0,03	0.0001 ⁶

Age, CD4 and viremia are expressed as mean ± SD. Sex, race and route of transmission were compared using Fisher exact test. Pairwise comparisons of CD4 and viremia for early phases were performed using unpaired Student's *t* tests. Comparisons among all groups (age at first visit, CD4 and viremia in the chronic phase and nadir CD4) were performed with the one-way analysis of variance test. MSM, men who have sex with men, HS, heterosexuals, IDU, intravenous drug users; n, numbers; NS, not significant; na, not available.

¹ P = 0.004 and 0.05 for the comparison of age between rapid and viremic slow progressors, and classic and viremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

² P = 0.004 for the comparison of CD4⁺ T cells/mm³ in chronic phase between rapid progressors and aviremic slow progressors as determined by the Mann-Whitney test.

³ P = 0.0008 and 0.001 and 0.02 nadir CD4 for the comparison between rapid and classic progressors, rapid and viremic slow progressors, and rapid and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

⁴ 50 copies/ml corresponds to the detection threshold of the viral load test

⁵ P = 0.002 for the comparison of viremia in chronic phase between classic progressors and aviremic slow progressors as well as for rapid and aviremic slow progressors, as determined by the Mann-Whitney test.

⁶ P = 0.006, 0.0007, 0.0005, 0.0004 and 0.001 for the comparison of peak viremia between rapid progressors and viremic slow progressors, rapid progressors and aviremic slow progressors, classic progressors and viremic slow progressors, classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

Figure Legends

Figure 1. Longitudinal analysis of plasma CXCL13 levels and CXCR5 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals. (a) Plasma concentrations (pg/ml) of CXCL13 in rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). Frequencies of B-cells expressing CXCR5 (left y axis) and levels of CXCR5 surface expression (geometric mean fluorescence intensity - geoMFI) (right y axis) by (b) total, (c) mature activated, (d) resting switched memory, (e) 'precursor' marginal zone (MZ)-like, (f) 'mature' MZ-like and (g) transitional immature (TI) B-cells of rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). The same HIV-negative values are used as a control for all three panels. Data are expressed as percentages of CXCR5 expressing-cells and intensity of surface expression within each B-cell population. Plasma concentrations and receptor expression were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 2. Longitudinal analysis of plasma CXCL12 levels and CXCR4 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals. (a) Plasma concentrations (pg/ml) of CXCL12 in rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). Frequencies of B-cells expressing CXCR4 (left y axis) and levels of CXCR4 surface expression (geometric mean fluorescence intensity -geoMFI) (right y axis) by (b) total, (c) mature activated, (d) resting switched memory, (e) 'precursor' marginal zone (MZ)-like, (f) 'mature' MZ-like and (g) transitional immature (TI) B-cells of rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). The same HIV-negative values are used as a control for all three panels. Data are expressed as percentages of CXCR4 expressing-cells and intensity of surface expression within each B-cell population. Plasma concentrations and receptor expression were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data

shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 3. Longitudinal analysis of plasma CXCL11 levels and CXCR7 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals. (a) Plasma concentrations (pg/ml) of CXCL11 in rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). Frequencies of B-cells expressing CXCR7 (left y axis) and levels of CXCR7 surface expression (geometric mean fluorescence intensity -geoMFI) (right y axis) by (b) total, (c) mature activated, (d) resting switched memory, (e) ‘precursor’ marginal zone (MZ)-like, (f) ‘mature’ MZ-like and (g) transitional immature (TI) B-cells of rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). The same HIV-negative values are used as a control for all three panels. Data are expressed as percentages of CXCR7 expressing-cells and intensity of surface expression within each B-cell population. Plasma concentrations and receptor frequencies were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparison of different phases of infection within each group and between study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 4. Longitudinal analysis of plasma CCL20 levels and CCR6 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals. (a) Plasma concentrations (pg/ml) of CCL20 in rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). Frequencies of B-cells expressing CCR6 (left y axis) and levels of CCR6 surface expression (geometric mean fluorescence intensity -geoMFI) (right y axis) by (b) total, (c) mature activated, (d) resting switched memory, (e) ‘precursor’ marginal zone (MZ)-like, (f) ‘mature’ MZ-like and (g) transitional immature (TI) B-cells by rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). The same HIV-negative values are used as a control for all three panels. Data are expressed as percentages of CCR6 expressing cells and intensity of surface expression within each B-cell population. Plasma

concentrations and receptor expression were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 5. Longitudinal analysis of plasma CCL25 levels and CCR9 expression by blood B-cells of HIV-infected individuals. (a) Plasma concentrations (pg/ml) of CCL25 in rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). Frequencies of B-cells expressing CCR9 (left y axis) and levels of CCR9 surface expression (geometric mean fluorescence intensity -geoMFI) (right y axis) by (b) total, (c) mature activated, (d) resting switched memory, (e) ‘precursor’ marginal zone (MZ)-like, (f) ‘mature’ MZ-like and (g) transitional immature (TI) B-cells by rapid (left panel), classic (middle panel) and slow progressors (right panel). The same HIV-negative values are used as a control for all three panels. Data are expressed as percentages of CCR9 expressing cells and surface expression within each B-cell population. Plasma concentrations and receptor expression were compared using the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 6. In vitro migration of B-cell populations towards CXCL13, CXCL12, CCL20 and CCL25.

In vitro migration index of total, mature activated, mature marginal zone (MZ)-like, precursor MZ-like, switched resting memory and transitional immature (TI) B-cells from the blood of classic progressors (n=3), aviremic slow progressors/elite controllers (EC) (n=3) and HIV-negative individuals (n=3) in response to (a) (500 ng/ml) CXCL13, (b) (250 ng/ml) CXCL12, (c) (10 ng/ml) CCL20 and (d) (100 ng/ml) CCL25. The in vitro

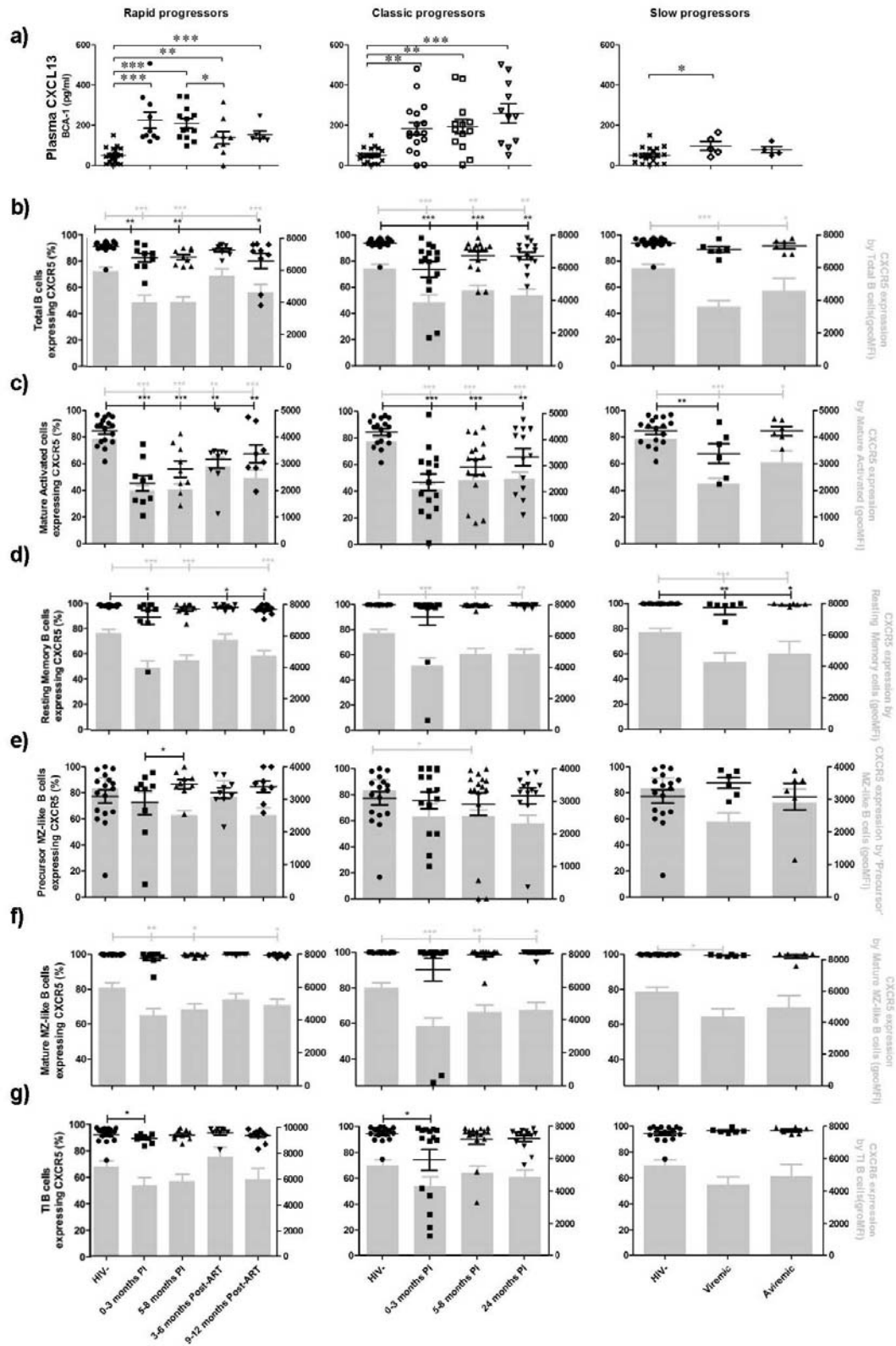
migration index is defined by the number of cells that have migrated in response to a given chemokine divided by the number of cells that have spontaneously migrated. Data were compared using the Wilcoxon signed rank test but no significant differences were observed between the migration index of HIV-negative controls, HIV-1-infected classic progressors or aviremic slow progressors/EC. Data shown are mean \pm SEM.

Supplementary Figure 1. Longitudinal variations of blood CD4⁺ T-cell counts and viral loads in HIV-1 infected individuals. (A) Blood CD4⁺ T-cell counts (cell/mm³) were determined by flow-cytometry in rapid progressors (left panel; 0–3 months PI (n = 13), 5–8 months PI (n = 14), 3–6 months ART (n = 8), 9–12 months ART (n = 4)), classic progressors (middle panel; 0–3 months PI (n = 16), 5–8 months PI (n = 18), 24 months PI (n = 11)), and slow progressors (right panel; viremic (n = 6), aviremic (n = 5)). (B) Viral loads (log copies/ml) were quantified by in vitro signal amplification nucleic acid probe assay of HIV-1 RNA (bDNA) in the plasma of rapid progressors (left panel; 0–3 months PI (n = 12), 5–8 months PI (n = 13), 3–6 months ART (n = 8), 9–12 months ART (n = 4)), classic progressors (middle panel; 0–3 months PI (n = 17), 5–8 months PI (n = 19), 24 months PI (n = 12)), and slow progressors (right panel; viremic (n = 4), aviremic (n = 3)). Cell populations and viral loads were compared using the Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. Significance levels are shown as * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001. PI, post-infection; ART, antiretroviral therapy.

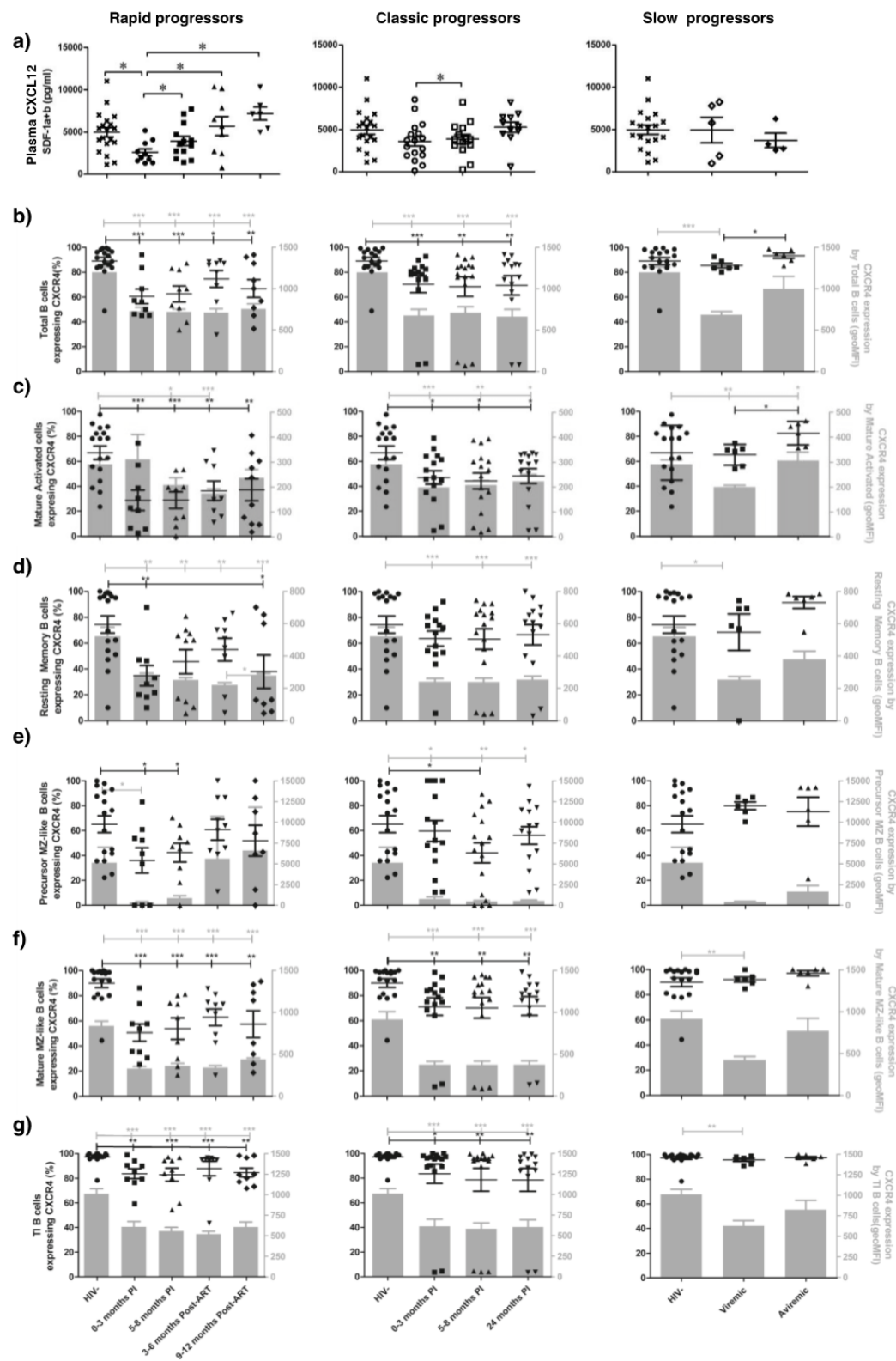
Supplementary Figure 2. Longitudinal analysis of blood B-cell populations of HIV-1 infected individuals.

Representative plot showing gating strategy on live PBMCs. Total CD19⁺ B-cells were selected based on expression of CD27 and/or IgM, and levels of CD21. CD1c and CD10 expression were used for further characterization of blood MZ and TI B-cell populations. Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Mature activated B-cells were defined as CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{lo}CD1c⁻CD10⁻, resting switched memory B-cells were CD19⁺CD27⁺IgM⁻CD21^{hi}CD10⁻, precursor marginal-zone (MZ)-like B-cells were CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{lo}CD1c⁺CD10⁺, mature MZ-like B-cells were CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{hi}CD1c⁺CD10⁻ and transitional immature (TI) B-cells were CD19⁺CD27⁺IgM⁺CD21^{hi}CD1c⁻CD10⁺. Receptor expression was assessed based on FMO and isotype controls within each individual population.

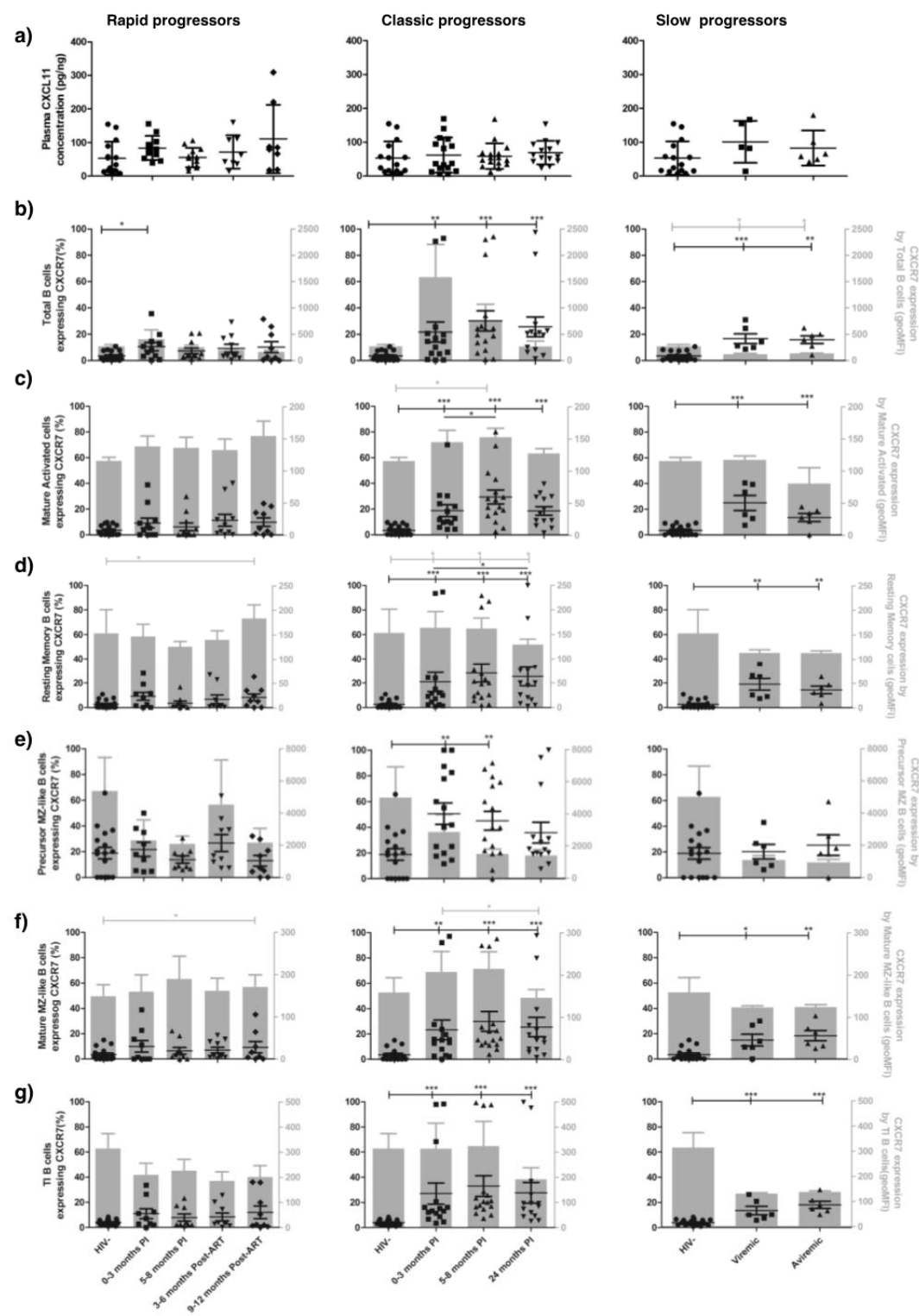
Article – Figure 1



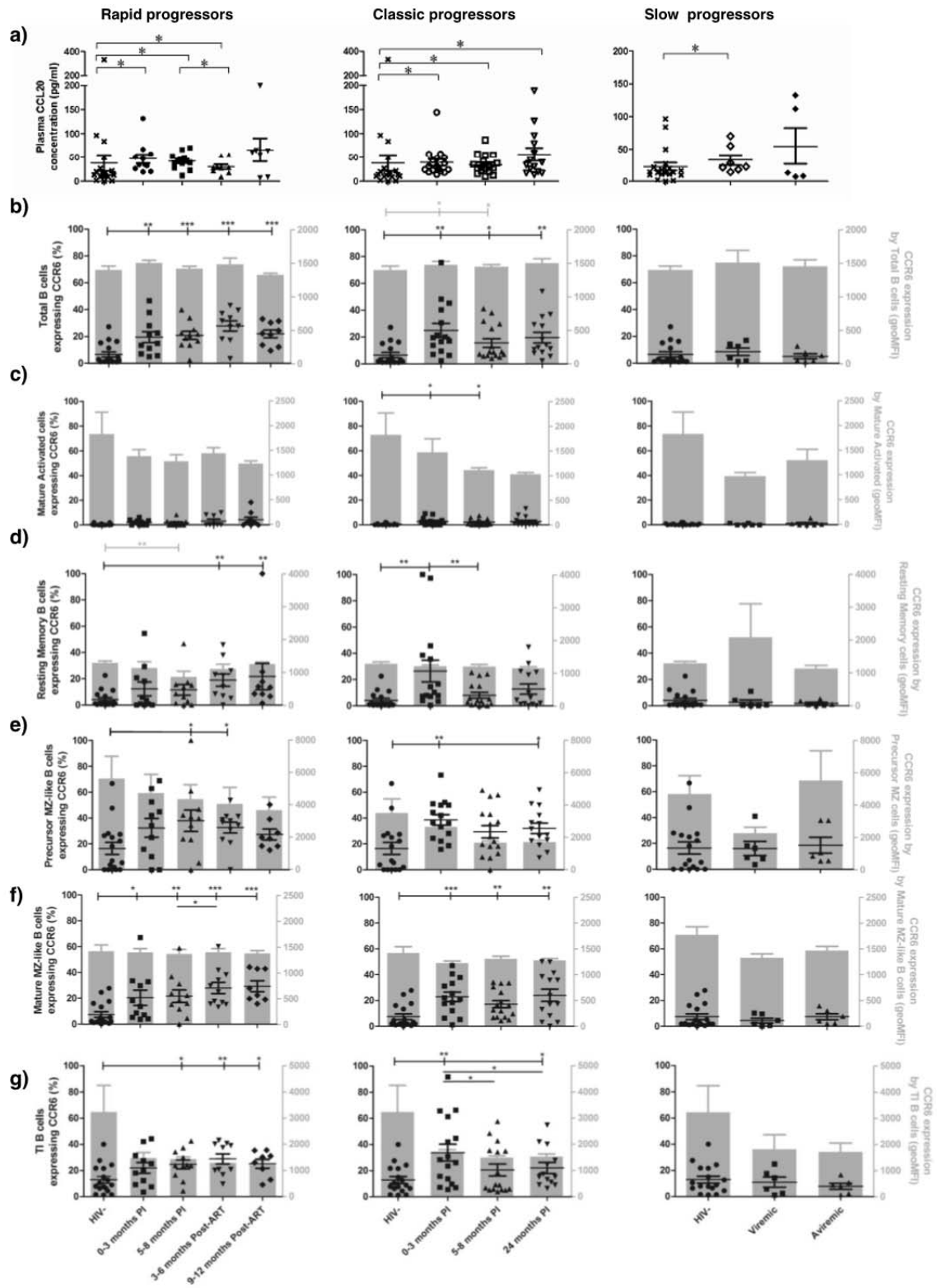
Article – Figure 2



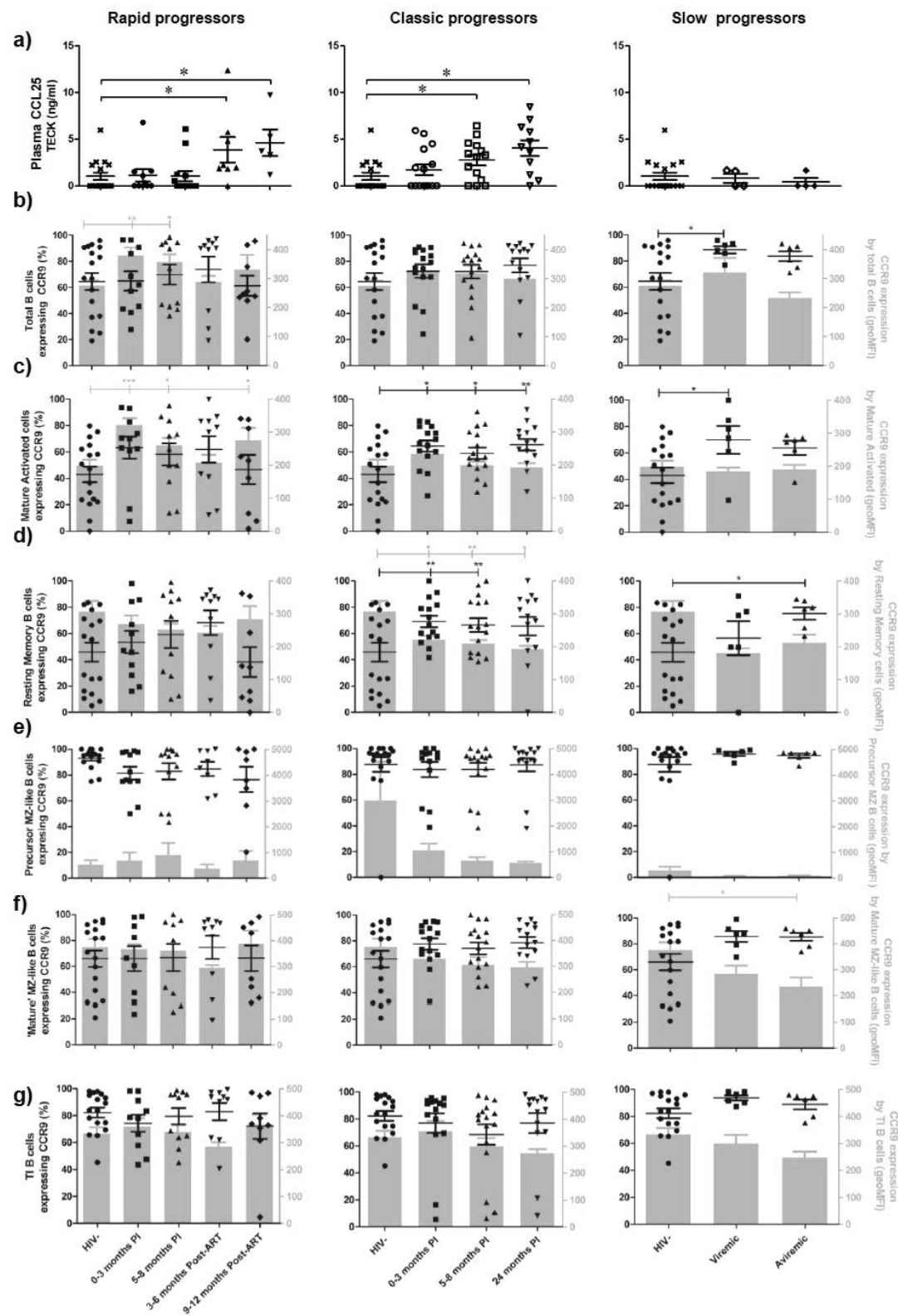
Article – Figure 3



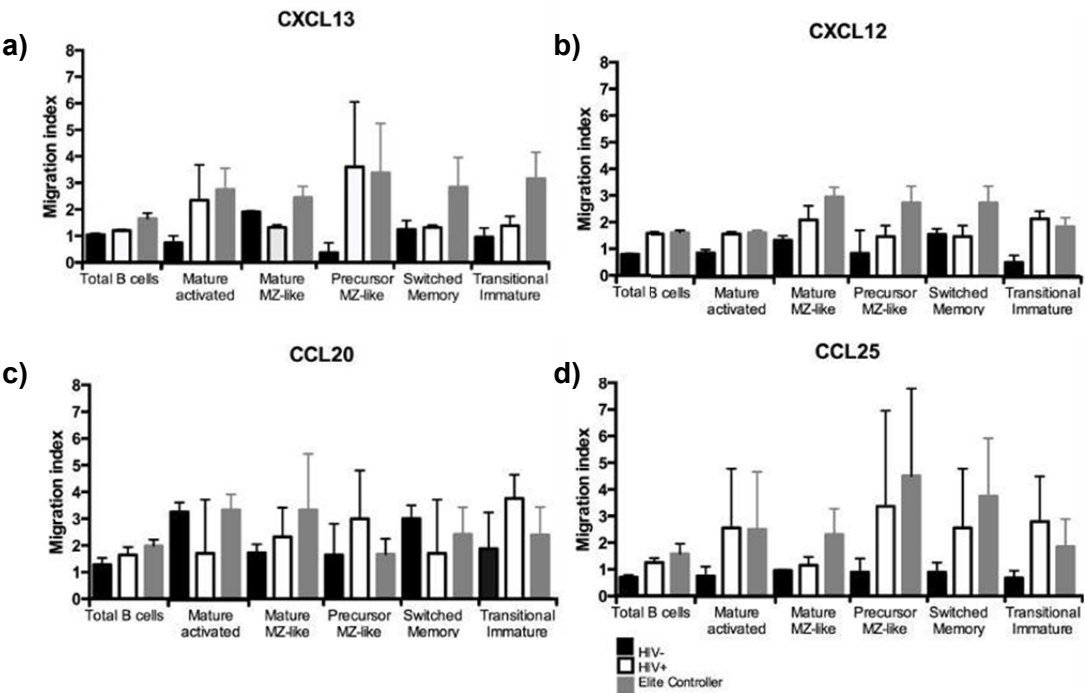
Article – Figure 4



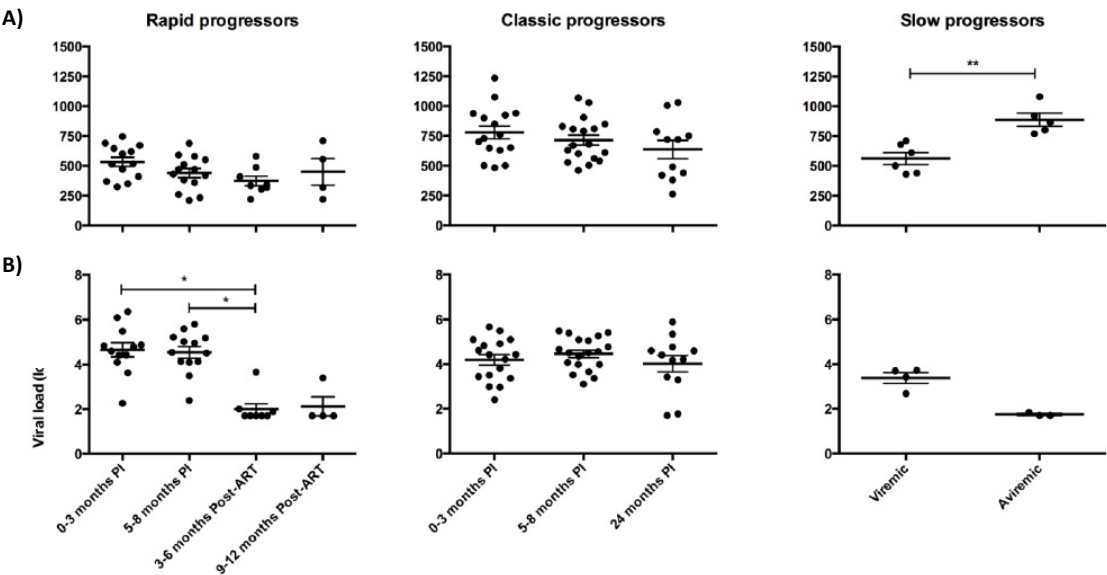
Article – Figure 5



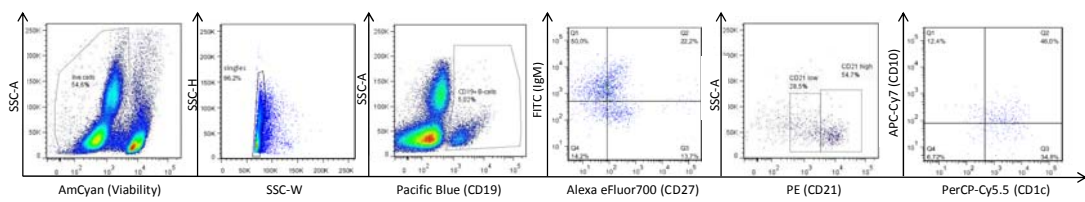
Article – Figure 6



Article – Figure supplémentaire 1



Article – Figure supplémentaire 2



Supplementary Figure 2: Longitudinal analysis of blood B-cell populations of HIV-1 infected individuals

DISCUSSION

En plus de l'atteinte aux lymphocytes T CD4⁺ décrite depuis les tous débuts de l'infection, il existe aujourd'hui plusieurs preuves de l'impact du VIH-1 sur le compartiment de lymphocytes B, cette conséquence de l'infection est souvent oubliée. On observe chez les individus infectés une activation polyclonale, une hausse du taux de renouvellement cellulaire et une variation importante des fréquences des différentes populations de lymphocytes B, entre autres. Notre étude s'ajoute à celles publiées précédemment et illustre l'ampleur de la situation tout en apportant une attention nouvelle aux cellules de la zone marginale. Nous avons confirmé chez l'homme les résultats obtenus dans des études précédentes chez la souris qui suggéraient un lien entre la sur-production de BLyS/BAFF par les DC et la dérégulation des lymphocytes B. Notre étude d'est aussi penchée sur l'implication des lymphocytes B de la zone marginale dans la lutte de première ligne contre le VIH-1.

Grace aux cohortes Primo-infection et de progresseurs lents du FRQS-SIDA, nous avons la possibilité de mener des études longitudinales qui permettent d'observer le déploiement de l'infection au VIH-1 chez des individus ayant différentes vitesses de progression de la maladie. Après avoir confirmé l'observation faite chez les souris VIH-Tg démontrant des niveaux élevés de BLyS/BAFF [78], nous avons également confirmé une dérégulation des fréquences relatives des populations du compartiment de lymphocytes B [34]. Une autre série d'étude chez la souris transgénique [107] a porté notre attention vers les cellules de la zone marginale qui est élargie chez les souris VIH-transgénique. Les progresseurs classiques et rapides présentent une diminution du nombre de lymphocytes B sanguins par rapport aux contrôles sains, mais on observe une augmentation relative de certaines populations dont les cellules matures activées et les 'précurseurs' de la MZ. Chez les progresseurs lents, cependant, il n'y a pas de changement significatif quant aux nombres de lymphocytes B périphériques mais on observe une diminution de la fréquence des cellules 'matures' de la MZ. Ces distinctions importantes entre les progresseurs classiques/rapides et lents indiquent vraisemblablement une implication des cellules de la MZ dans le maintien de l'immunité lors d'une infection au VIH.

Le présent projet avait comme objectif de caractériser le profil migratoire des différentes populations de cellules B chez ces progressseurs rapides, classiques et lents en mesurant les niveaux sanguins de chimiokines ainsi que l'expression de leurs récepteurs sur les cellules B étudiées. Cette étude vient ajouter aux données déjà recueillies sur ces individus et permet de dresser un portrait encore plus complet du statut immunitaire à différents stades de l'infection au VIH-1. Un défi du travail avec les cohortes du FRQS-SIDA est l'absence de biopsies des tissus intestinaux. Nous sommes limités dans nos mesures à des spécimens sanguins pour évaluer les niveaux de chimiokines. Or, ces molécules sont produites de façon importante dans divers organes auxquels nous n'avons pas accès. Bien que le sang reflète tout de même l'état pathologique, il est possible que la situation observée dans les tissus soit différente. De façon générale, la modulation des niveaux de chimiokines et des récepteurs associés, mesurés dans le sang, est plus prononcée chez les progressseurs classiques et rapides que chez les progressseurs lents et contrôleurs élités.

Modulation des axes chimiotactiques B-tropiques – étude *ex vivo*

Sachant que les organes lymphoïdes sont sérieusement atteints lors d'une infection au VIH, le premier axe chimiokine-récepteur analysé fut CXCL13-CXCR5. Tout d'abord, nos résultats concordent avec des études précédentes démontrant des niveaux élevés de CXCL13 sanguins chez tous les individus virémiques [87]. Cette augmentation est partiellement corrigée chez les individus suivant des traitements antirétroviraux. Les niveaux de CXCL13 chutent durant le traitement mais demeurent plus élevés que les contrôles sains [87]. Ces observations vont de pair avec une étude récente démontrant que l'ARN simple brin du VIH-1 induit la production de CXCL13 par les monocytes chez les humains [108]. Ici, tous les individus chez qui l'on détecte le virus ont des niveaux élevés de CXCL13. En accord avec les publications de Cagigi et al[63] et de Moir et Fauci 2009 [54] nous avons constaté une expression réduite de CXCR5 chez les individus infectés par rapport aux contrôles sains, particulièrement pour les lymphocytes B matures activés. L'augmentation importante de CXCL13 dans le sang peut provoquer une saturation des récepteurs CXCR5 ce qui expliquerait la réduction de leur expression à la surface des cellules B. Également, l'excès de CXCL13 peut contribuer à une dérégulation de l'axe

migratoire CXCL13-CXCR5 et pourrait expliquer la hausse de cellules matures activées détecté dans le sang des individus virémiques [63, 87]. La dérégulation de cet axe chimiotactique contribue aussi aux altérations des centres germinatifs documentés chez les souris, primates ainsi que chez les humains.

Cagigi *et al* suggèrent que l'expression altérée de CXCL13 et CXCR5 chez les individus infectés contribue à la dérégulation du compartiment B suite à l'infection [63]. CXCL13 est normalement exprimée par les cellules dendritiques folliculaires et stromales des zones B. Cependant, l'ARNm de CXCL13 a été détecté dans les cellules B de patients infectés par le VIH-1 et des cellules B CXCL13⁺ ont été identifiées dans leurs tissus alors que les cellules des contrôles sains demeurent CXCL13⁻. Cette expression de CXCL13 par les lymphocytes B en situation d'hyperactivation immunitaire contribue probablement à l'excès de cette chimiokine qui est détecté lors de l'infection au VIH-1[63].

La surexpression de CXCL13 cause l'internalisation excessive du récepteur CXCR5 qui en retour impacte la migration normale de lymphocytes B aux centres germinatifs des organes lymphoïdes. Les changements de gradients chimiotactiques font en sorte que certaines populations B se retrouvent dans la circulation alors qu'elles ne le sont pas généralement ou vice-versa. Ces phénomènes représentent vraisemblablement une des multiples causes de la dérégulation du compartiment de cellules B.

Nous avons observé une variation des niveaux de CXCL12, chimiokine responsable de l'appel à la moelle osseuse, aux organes lymphoïdes et en périphérie, chez les progressseurs rapides. Les niveaux de cette chimiokine sont diminués par rapport aux contrôles sains en début d'infection et sont rétabli à un niveau plus ou moins normal suite à ART sans toutefois atteindre le niveau des VIH⁻. Le pourcentage de cellules B exprimant CXCR4 est quant à lui diminué pour toutes les populations B chez les progressseurs classiques et rapides alors que les progressseurs lents maintiennent des niveaux semblables à ceux des contrôles non-infectés. L'expression de CXCR7, un autre récepteur de CXCL12 ne présente pas de variation chez les progressseurs rapides. Au contraire des niveaux de CXCL12, on observe une augmentation de la fréquence des cellules exprimant CXCR7 chez les progressseurs classiques ainsi que chez les

progresseurs lents pour la majorité des populations B. Il est important de noter que ce récepteur est le seul parmi ceux que nous avons analysés pour qui la fréquence de cellules qui l'exprime est affecté chez les contrôleurs élités.

CXCR7 est un récepteur de CXCL11 et CXCL12. Son affinité pour CXCL12 est plus élevée que CXCR4, récepteur primaire connu pour cette chimiokine, et il agit en tant que « scavenger » de CXCL12 pour réguler sa liaison à CXCR4 [109]. Des analyses ont démontrées que suite à une exposition à CXCL12, CXCR4 et CXCR7 sont internalisés par la cellule. Cependant, CXCR7 est rapidement rétabli à la surface alors que CXCR4 demeure internalisé [109]. Une altération à ce mécanisme d'internalisation et recyclage du récepteur peut expliquer les augmentations mesurées dans nos populations B chez les progresseurs classiques et lents.

De plus hautes fréquences de cellules exprimant CXCR7 semblent être bénéfique puisque celles-ci sont augmentées pour toutes les populations chez les progresseurs lents et classiques alors que les progresseurs rapides qui contrôlent le moins bien l'infection ont des niveaux normaux de cellules exprimant CXCR7. On observe également que pour ces deux groupes, les niveaux de CXCL12 sont maintenus à des niveaux normaux, possiblement par l'action de CXCR7. Il est possible que la maladie se développe trop soudainement chez les progresseurs rapides pour permettre l'établissement de cette boucle d'élimination de CXCL12. En lien avec l'importance de CXCR7, il a été démontré que les souris transgéniques *cxc7^{-/-}* meurent prématurément, semble-t-il par manque d'évacuation de CXCL12 [110]. D'autres études plus récentes chez la souris ont démontré que le récepteur CXCR7 était exprimé à la surface des cellules B de la MZ mais pas par les cellules folliculaires ou autres types cellulaires [111]. Également, l'utilisation de CCX754, un inhibiteur de CXCR7 résulte en une altération importante de l'organisation de la MZ ainsi qu'une accumulation de CXCL12 dans la circulation sanguine [111]. Récemment, une étude a démontré que l'expression de CXCR7 augmente sur les cellules sortant des centres germinatifs alors que l'expression de CXCR5 diminue [112]. Ces informations illustrent l'importance de CXCR7 pour le bon positionnement des cellules dans la zone marginale et la sortie des centres germinatifs ainsi que pour le maintien de niveaux adéquats de la chimiokine CXCL12. Ces résultats chez la souris sont

très intéressants pour notre étude car CXCR7 est le seul récepteur dont l'expression est modulé chez les contrôleurs élités dans le contexte d'une infection au VIH-1. Ces individus arrivent à maintenir l'intégrité des muqueuses et ont des niveaux normaux de la chimiokine CXCL12. Dans les centres germinatifs, le contrôle des niveaux de CXCL12 par CXCR7 peut favoriser la sortie vers la circulation sanguine de cellules B mémoires et plasmablastes prêtes à combattre le virus [112]. De plus, considérant le rôle important de lymphocytes B de la MZ dans la réponse de première ligne contre les infections, si les niveaux de CXCR7 permettent un meilleur maintien de l'intégrité de ce compartiment chez les progresseurs classiques et lents, ceci peut possiblement expliquer en partie leur capacité à mieux gérer l'infection que leurs homologues rapides.

Les niveaux de la chimiokine CCL20, responsable du recrutement de cellules vers les muqueuses intestinales, sont augmentés dans le sang de tous les individus virémiques de nos cohortes et ce, tout au long de l'infection. Une telle augmentation est bien documentée dans les contextes d'inflammation, comme c'est le cas lors d'une infection au VIH-1. Parmi nos cohortes, seul le groupe de contrôleurs élités maintient des niveaux normaux pendant l'infection, ces individus sont d'ailleurs en mesure de contrôler l'inflammation associée au virus. Tel que décrit dans la littérature nous remarquons un niveau d'expression de CCR6 variant selon le niveau de maturité des lymphocytes B [101]. Une augmentation des niveaux d'ARNm de CCR6 et de récepteur en surface sont observés dans les cas d'infection par EBV. Pour notre part, dans le contexte de l'infection au VIH-1, nous remarquons également une augmentation de la fréquence de cellules exprimant CCR6 chez les individus VIH-1-positifs par rapport aux contrôles sains.

L'axe CCL20-CCR6 est important pour l'organogénèse des tissus lymphoïdes du système digestif. Ces molécules permettent le recrutement de cellules B vers l'épithélium où les cellules B assistent les cellules avoisinantes dans la construction de structures telles que les Plaques de Peyer [85]. Cet axe chimiotactique est donc fondamental pour le maintien d'une bonne réponse immunitaire dans le tractus gastro-intestinal, site d'entrée du VIH-1 dans la grande majorité des infections. Il est possible que l'augmentation de CCL20 détectée dans le sang des progresseurs rapides et classique ait pour but de recruter

des cellules vers les muqueuses intestinales pour aider à combattre l'infection en cours. Par ailleurs, les progressseurs lents avirémiques, chez qui l'infection est contrôlée, n'auraient pas besoin de ce recrutement et maintiennent des niveaux normaux de CCL20. Lors de l'analyse des résultats obtenus pour CCL20, il est important de se souvenir que cette chimiokine génère aussi une réponse auprès des Th17, Tregs et DC, ce qui complique l'interprétation [101, 113].

TECK, ou CCL25 est une chimiokine exprimée dans le thymus et l'intestin. Nous l'avons sélectionnée pour sa contribution au recrutement vers le GI, site important pour le VIH-1. Cette chimiokine est exprimée dans l'intestin par les cellules épithéliales des villosités et contribue au recrutement de cellules B vers cette région [103]. Contrairement à nos attentes, les concentrations de CCL25 sont seulement augmentées en fin d'infection pour les progressseurs classiques et suite à ART chez les progressseurs rapides. Les contrôleurs élités ne présentent aucun changement par rapport aux contrôles sains. Si l'organisme tente de recruter des cellules aux muqueuses intestinales pour combattre l'infection, il semble que des chimiokines autres que CCL25 soient employées. Il a été démontré chez la souris que l'absence de CCR9 n'est pas fatale, suggérant une redondance avec d'autres chimiokines ayant des fonctions similaires [114]. Des études subséquentes sont nécessaires pour élucider cet aspect. CCL25 a aussi un récepteur atypique connu, CCX-CKR, qui peut éliminer l'excès de la chimiokine comme le fait CXCR7 avec CXCL12 [115].

L'expression du récepteur CCR9 est très hétérogène parmi une même population de cellules B et ce même chez les individus VIH⁺. Des variables non prises en compte dans cette étude entrent probablement en jeu. On remarque cependant que chez les LTNP l'expression est beaucoup plus homogène par rapport à la grande étendue des résultats chez les autres groupes. Ce groupement de résultats démontre possiblement le contrôle que ces individus exercent sur la situation. Il est aussi possible que l'expression de CCR9 se stabilise ou atteigne un plateau après plusieurs années d'infection comme c'est le cas chez les progressseurs lents.

De façon générale, on remarque que les contrôleurs élités maintiennent des niveaux semblables à ceux des contrôles sains tant pour les chimiokines que pour l'expression des

récepteurs analysés. Le changement le plus important dénoté chez ce groupe est l'augmentation de la fréquence de cellules exprimant CXCR7. Ce dernier contribue probablement au maintien de niveaux normaux de CXCL12 par le mécanisme d'évacuation de chimiokines excédentaires. De plus l'association de ce récepteur aux cellules de la MZ pointe vers une implication de ce compartiment dans le contrôle de l'infection.

Étude de migration *in vitro*

Nous avons mené des essais de chimiotactisme *in vitro* à partir de cellules B isolées de patients appartenant aux cohortes décrites précédemment. De façon générale, les cellules isolées de patients infectés ont un plus grand indice de migration que les cellules de patients sains. Ceci s'explique probablement par l'état d'activation immunitaire présente lors de l'infection. Brandes et al [84] ont effectué des tests similaires sur des cellules B en santé. Ils démontrent que cultiver les cellules avant l'expérience résulte en une augmentation significative de l'index de migration des cellules. Cependant, cette augmentation n'est pas due à une hausse de l'expression des récepteurs. Il y a donc un autre facteur qui régule la réponse migratoire aux chimiokines. Également, l'activation des cellules par LPS ou CD40 influence positivement le potentiel migratoire des cellules. Une activité d'attraction supérieure a été décrite pour CXCL13 et CXCL12 par rapport à CCL25 et CCL20 autant pour les cellules fraîches que cultivées [84]. Nous observons généralement l'inverse pour les cellules B totales analysées. Tel qu'illustré par notre analyse de l'expression des récepteurs, il est fort possible que le contexte inflammatoire et la dérégulation observée chez les populations de cellules B impacte leur capacité migratoire *in vitro*. Par exemple, une saturation des récepteurs cellulaires causée par les niveaux élevés de certaines chimiokines pourrait empêcher une réponse migratoire. Pour plusieurs populations, dont les cellules matures de la MZ, le plus grand index de migration appartient aux cellules provenant des contrôleurs élite. Il semble donc que le maintien de niveaux normaux de chimiokines sanguines et ou de récepteurs lors de l'infection permet de conserver un mécanisme de migration en meilleur état que chez les progressseurs classiques et est favorable au contrôle de l'infection.

Évidemment, dans le contexte *in vivo* toutes ces chimiokines et les mécanismes qui les accompagnent interagissent et viennent compliquer la situation. Par exemple, l'équipe de Yolande Richard a démontré que gp120, une protéine du VIH-1 est en mesure d'inhiber la migration vers CCL20 et CXCL12 [116]. Cependant, nos essais *in vitro* sont effectués avec des cellules B isolées, ce qui ne permet pas d'évaluer l'effet de la présence de particules virales. L'étude actuelle nous offre quand même des indices importants sur les changements qui affectent le compartiment B lors d'une infection au VIH-1.

CONCLUSION

Considérant l'importance immunitaire des lymphocytes B dans la lutte contre les infections, il est primordial de continuer à tenter de mieux comprendre les modifications subites par ces cellules lors d'une infection par le VIH-1. Les dérégulations de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs contribuent aux dommages à l'immunité humorale observés au cours de l'infection[63]. Des expériences longitudinales démontrent que plusieurs altérations, notamment pour les cellules B, ne sont jamais rétablies même après plusieurs années de traitement antirétroviral. Ceci est également visible dans le cas de l'expression de certaines chimiokines et des récepteurs associés qui sont altérés par rapport aux contrôles pendant toute la durée de l'infection.

Il est clair que chacun des trois groupes analysés dans cette étude réagit différemment à l'infection par sa production de chimiokines et de récepteurs sur les cellules B. L'augmentation dans le sang des chimiokines CXCL13 et CCL20 chez les progressseurs rapides et classiques suggère une tentative de recrutement de cellules vers les organes lymphoïdes et les muqueuses intestinales pour combattre le virus. Au contraire, dans un contexte où l'inflammation est mieux contrôlée, le groupe de progressseurs lents est en mesure de maintenir des niveaux normaux de chimiokines dans le sang. Ce contrôle est aussi reflété dans l'expression des récepteurs à chimiokines qui reste très semblable aux niveaux des contrôles sains. L'homéostasie des axes chimiotactiques semble donc importante dans la lutte contre l'infection au VIH-1.

PERSPECTIVES

À l'heure actuelle, beaucoup d'efforts sont concentrés sur le développement de méthodes de prophylaxie pour empêcher l'établissement d'une infection par le VIH-1. Étant donné le rôle primordial des cellules B dans l'immunité humorale, nous croyons qu'il est important de bien comprendre le fonctionnement de ce compartiment cellulaire, autant chez les individus sains que dans les cas d'infection, afin d'adapter les traitements potentiels à l'état du compartiment B.

L'étude présentée ici illustre bien l'impact important qu'a l'infection sur l'intégrité du compartiment de cellules B. Il est donc essentiel de considérer ces changements dans la fréquence des populations ainsi que les mécanismes sous-jacents lors de l'élaboration de traitements ou encore d'un vaccin efficace. Une activité intacte des cellules B, particulièrement aux muqueuses, est essentielle pour la production d'anticorps pouvant aider au contrôle du virus. Il est important de continuer à étudier le rôle d'une réponse de première ligne telle que celle des cellules de la MZ dans le contexte de la progression par rapport au contrôle de l'infection. L'étude de ce volet du système immunitaire se poursuit au laboratoire, notamment par la tenue de tests de migration *in vitro* supplémentaires afin d'obtenir de plus grands groupes de résultats à comparer. Les cohortes du FRQS-SIDA sont un outil incomparable pour mieux comprendre les événements suivant l'entrée du VIH-1 particulièrement dans les situations de contrôle de l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

1. Shors, T., *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*, in *Understanding Viruses*. 2013, Jones & Bartlett Learning: Burlington, MA, USA.
2. Gallo, R.C. and L. Montagnier, *The Discovery of HIV as the Cause of AIDS*. The New England Journal of Medicine, 2003. **394**(24).
3. Freed, E.O. and M.A. Martin, *Human Immunodeficiency Viruses*, in *Fields Virology*, D. Knipe, M. and P. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.
4. Gisselquist, D., *Emergence of the HIV Type 1 Epidemic in the Twentieth Century: Comparing Hypotheses to Evidence*. AIDS Research and Human Retroviruses, 2003. **19**(12): p. 8.
5. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. The Lancet, 2014. **384**: p. 258-271.
6. Derdeyn, C.A. and G. Silvestri, *Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection*. Current Opinion in Immunology, 2005. **17**: p. 336-373.
7. Feng, Y., et al., *Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif*. Frontiers in Microbiology, 2014. **5**.
8. Guenzel, C.A., C. Hérate, and S. Benichou, *HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker"*. Frontiers in Microbiology, 2014. **5**.
9. Strebel, K., *HIV accessory proteins versus host restriction factors*. Current Opinion in Virology, 2013. **3**(6): p. 692-699.
10. Basmaciogullari, S. and M. Pizzato, *The activity of Nef on HIV-1 infectivity*. Frontiers in Microbiology, 2014. **5**.
11. Schaefer, M.R., et al., *HIV-1 Nef Targets MHC-I and CD4 for Degradation Via a Final Common B-COP-Dependant Pathway in T cells*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(8): p. 18.
12. Chagnon-Choquet, J., et al., *HIV Nef promotes BlyS/BAFF expression by blood dendritic cells during the course of infection in humans*. J Infect Dis, 2014.
13. Grossman, Z., et al., *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys*. Nature, 2006. **12**(3): p. 289-295.
14. Wu, L. and C.M. Coleman, *HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs*. Retrovirology, 2009. **6**(51): p. 12.
15. Burdo, T.H., A. Lackner, and K.C. Williams, *Monocyte/macrophages and their role in HIV neuropathogenesis*. Immunological Reviews, 2013. **254**(1): p. 12.
16. Blom, B. and H. Spits, *Development of Human Lymphoid Cells*. The Annual Review of Immunology, 2006. **24**: p. 287-320.
17. Eibel, H., et al., *B cell Biology: An Overview*. Current Allergy and Asthma Report, 2014. **14**: p. 433-443.
18. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. Mechanisms of allergic diseases, 2013. **131**: p. 959-971.
19. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nature Reviews - Immunology, 2009. **9**: p. 767-777.
20. Perez-Andres, M., et al., *Human Peripheral Blood B-Cell Compartments: A Crossroad in B-Cell Traffic*. International Clinical Cytometry Society, 2010. **78B**(Suppl. 1): p. S47-S60.
21. Reynaud, C.-A. and L. Chatenoud, *Lymphocytes B*, in *Immunologie*, E. Leclerc, Editor. 2012, Lavoisier: Paris.
22. Weill, J.-C., S. Weller, and C.-A. Reynaud, *Human Marginal Zone B-cells*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**: p. 21.

23. Owen, J.A., J. Punt, and S.A. Stranford, *Activation, différenciation et mémoire des lymphocytes B*, in *Immunologie - Le cours de Janis Kuby*, W.H. Freeman, Editor. 2013, Dunod: Paris.
24. Okada, T., et al., *Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T cells*. *PloS Biology*, 2005. **3**(6): p. e150.
25. Hauser, A.E., et al., *Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response*. *Journal of Immunology*, 2002. **169**: p. 1277-1282.
26. Stolp, J., et al., *Intrinsic molecular factors cause aberrant expansion of the splenic marginal zone B cell population in nonobese diabetic mice*. *Journal of Immunology*, 2013. **191**(1): p. 97-109.
27. Parker, D., *T cell-independent B cell activation*. *Annual Review of Immunology*, 1993. **11**: p. 331-360.
28. He, B., et al., *The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88*. *Nature Immunology*, 2010. **11**: p. 836-845.
29. Vos, Q., et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms*. *Immunological Reviews*, 2000. **176**: p. 154-170.
30. Krljanac, B., et al., *NF-kB2/p100 deficiency impairs responses to T-cell-independent type 2 antigens*. *European Journal of Immunology*, 2014. **44**(3): p. 662-672.
31. LeBien, T. and T. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. *blood*, 2008. **112**(5): p. 2570-1580.
32. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune Regulatory Function of B Cells*. *Annual Review of Immunology*, 2012. **30**: p. 221.
33. Siewe, B., et al., *Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8+ T cell function in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013. **93**.
34. Chagnon-Choquet, J., et al., *IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(7): p. e101949.
35. Lund, F.E. and T.D. Randall, *Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity*. *Nature Reviews - Immunology*, 2010. **4**: p. 236-247.
36. (OMS), O.M.d.I.S. *Global Summary of the AIDS Epidemic - 2013*. 2014; Available from: http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1.
37. UNAIDS, *The GAP Report*. 2014, UNAIDS: Genève, Suisse.
38. Moir, S., T.-W. Chun, and A.S. Fauci, *Pathogenic Mechanisms of HIV Disease*. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2010. **6**: p. 223-248.
39. G., P. and A.S. Fauci, *Immunopathogenesis of HIV Infection*. *Annual Review of Microbiology*, 1996. **50**: p. 825-854.
40. Haase, A.T., *Early Events in Sexual Transmission of HIV and SIV and Opportunities for Interventions*. *Annual Review of Medicine*, 2011. **62**: p. 127-139.
41. Ancuta, P., P. Monteiro, and R.-P. Sekaly, *Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis*. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2010. **5**(2): p. 158-165.
42. Centlivre, M., et al., *In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection*. *AIDS*, 2007. **21**(1): p. 1-11.
43. Naif, H.M., *Pathogenesis of HIV infection*. *Infectious Disease Reports*, 2013. **5**.

44. Whitney, J.B., et al., *Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys*. Nature, 2014.
45. Moir, S. and A.S. Fauci, *Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals*. Immunological Reviews, 2013. **254**: p. 18.
46. Fontaine, J., et al., *HIV Infection Affects Blood Myeloid Dendritic Cells after Successful Therapy and despite Nonprogressing Clinical Disease*. Journal of Infectious Diseases, 2009. **199**: p. 12.
47. Deeks, S.G. and B.D. Walker, *Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy*. Immunity, 007. **27**: p. 406-416.
48. NIAID. *Types of HIV/AIDS Antiretroviral Drugs*. HIV/AIDS 2013 [cited 2015].
49. Iyidogan, P. and K.S. Anderson, *Current Perspectives on HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance*. Viruses, 2014. **6**(10): p. 4095-4139.
50. Services, D.o.H.a.H. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. 2015 [cited 2014 11-17-2014]; Available from: <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
51. Moir, S., et al., *B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy*. blood, 2010. **116**(25): p. 5571-5579.
52. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS*. Annual Review of Medicine, 2009. **60**: p. 471-484.
53. Miedema, F., et al., *Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis*. Frontiers in Immunology, 2013. **4**.
54. Moir, S. and A.S. Fauci, *B cells in HIV infection and disease*. Nature Reviews - Immunology, 2009. **9**: p. 11.
55. Fontaine, J., et al., *High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans*. blood, 2011. **117**(1).
56. Doitsh, G., et al., *Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 509-14.
57. Gosselin, A., et al., *Peripheral Blood CCR4+CCR6+ nad CXCR3+CCR6+ CD4+ T Cells Are Highly Permissive to HIV-1 Infection*. The Journal of Immunology, 2009. **184**(3): p. 1604-1616.
58. Wang, H. and D.P. Kotler, *HIV enteropathy and aging: gastrointestinal immunity, mucosal epithelial barrier, and microbial translocation*. Current opinion in HIV and AIDS, 2014. **9**(4): p. 309-316.
59. Miller, E. and N. Bhardwaj, *Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection*. Immunological Reviews, 2013. **254**(1): p. 170-189.
60. Yonkers, N.L., et al., *Systemic Immune Activation in HIV Infection Is Associated with Decreased MDC Responsiveness to TLR Ligand and Inability to Activate Naive CD4 T-Cells*. PLoS ONE, 2011. **6**(9).
61. McGowan, J.P., et al., *Relationship of serum immunoglobulin and IgG subclass levels to race, ethnicity and behavioral characteristics in HIV infection*. Medical Science Monitor, 2006. **12**(1).
62. Fontaine, J., J. Poudrier, and M. Roger, *Short Communication: Persistence of High Blood Levels of Chemokines CCL2, CCL19 and CCL20 During the Course of HIV Infection*. AIDS Research and Human Retroviruses, 2011. **27**(6): p. 3.

63. Cagigi, A., et al., *Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection*. *blood*, 2008. **112**(12).
64. Rappocciolo, G., et al., *DC-SIGN on B Lymphocytes Is Required For Transmission of HIV-1 to T Lymphocytes* *PLoS Pathogens*, 2006. **2**(7): p. e70.
65. Poulin, L., et al., *Productive infection of normal CD40-activated human B lymphocytes by HIV-1*. *AIDS*, 1994. **8**: p. 1539-1544.
66. Buckner, C.M., et al., *Characterization of Plasmablasts in the Blood of HIV-Infected Viremic Individuals: Evidence for Nonspecific Immune Activation*. *Journal of Virology*, 2013. **87**(10).
67. Vendrame, E., et al., *Serum Levels of Cytokines and Biomarkers for Inflammation and Immune Activation, and HIV-Associated Non-Hodgkin B-Cell Lymphoma Risk*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2014. **23**(2): p. 343-349.
68. Moir, S., et al., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2008. **205**(8): p. 1797-1805.
69. Ehrhardt, G.R.A., et al., *Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005. **202**(6): p. 783-791.
70. Moir, S. and A.S. Fauci, *B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation*. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2014. **9**(5): p. 472-477.
71. Cagigi, A., et al., *Dysfunctional B-cell responses during HIV-1 infection: implication for influenza vaccination and highly active antiretroviral therapy*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010. **10**(7): p. 499-503.
72. Hart, M., et al., *Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease*. *Journal of Immunology*, 2007. **178**(12): p. 8212-8220.
73. Cubas, R. and M. Perreau, *The dysfunction of T follicular helper cells*. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2014. **9**: p. 485-491.
74. Xu, W., et al., *HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intracellular conduits*. *Nature Immunology*, 2009. **10**: p. 1008-1017.
75. De Milito, A., et al., *Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2180-2186.
76. Moir, S., et al., *Normalization of B Cell Counts and Subpopulations after Antiretroviral Therapy in Chronic HIV Disease*. *Journal of Infectious Diseases*, 2008. **197**.
77. Poudrier, J., et al., *The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice is Associated with Accumulation of Immature CD11bHI Dendritic Cells*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(21): p. 13.
78. Mackay, F., et al., *Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations*. *Journal of Experimental Medicine*, 1999. **190**(11): p. 1697-1719.
79. Arnolds, K.L. and J.V. Spencer, *CXCR4: A virus's best friend?* *Infection, Genetics and Evolution*, 2014. **25**: p. 10.
80. Janeway, C.A.J., et al., *Activated macrophages secrete a range of cytokines that have a variety of local and distant effects*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, G. Science, Editor. 2001: New York.
81. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity*. *Immunity*, 2000. **12**: p. 7.

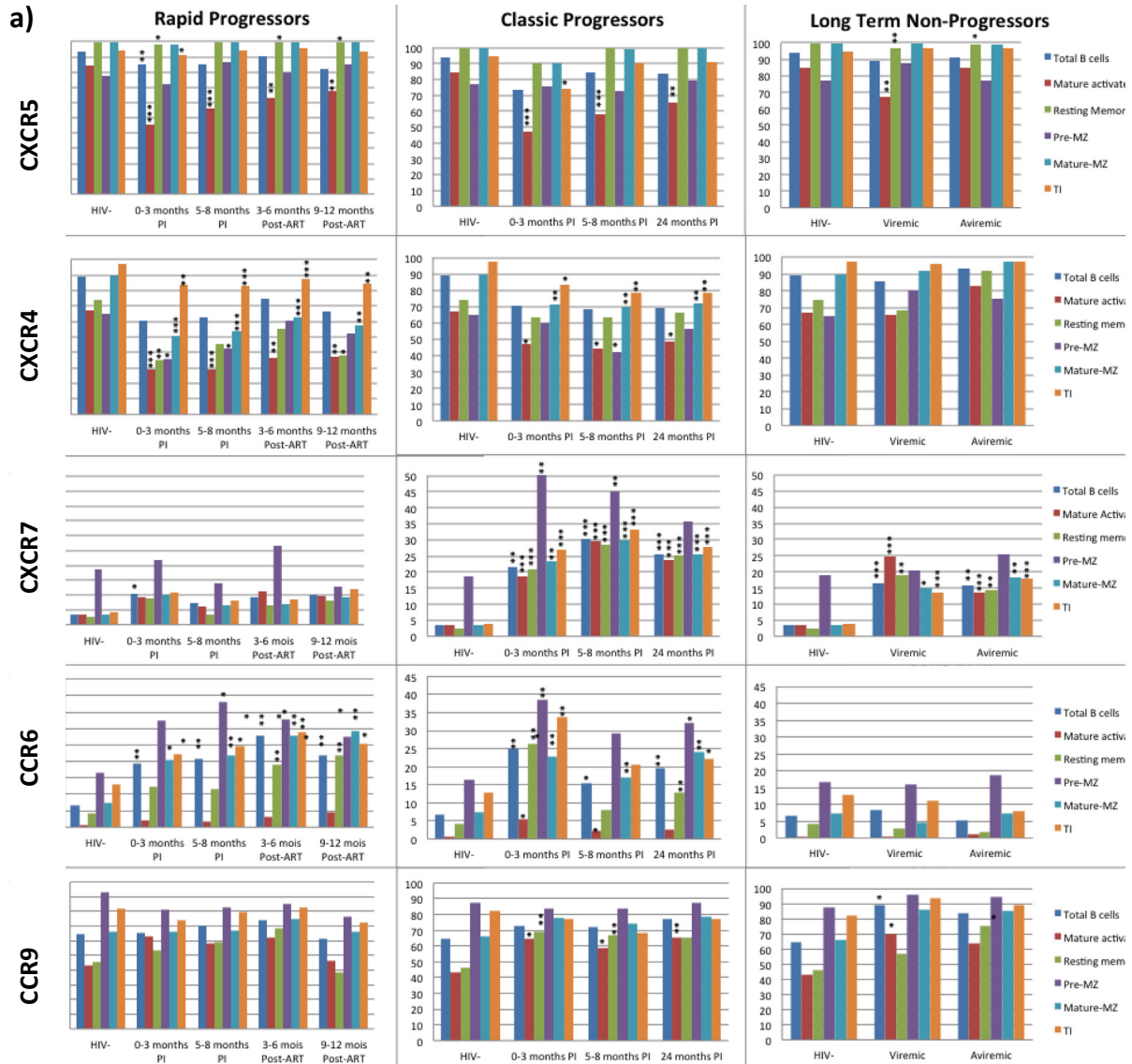
82. Würth, R., et al., *CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014. **8**.
83. Singh, A., et al., *CXCL12/CXCR4 protein signalling axis induces sonic hedgehog expression in pancreatic cancer cells via extracellular regulated kinase- and Akt-mediated activation of nuclear factor kB: implications for bidirectional tumor-stromal interactions*. *The Journal of biological chemistry*, 2012. **287**(46): p. 39115-39124.
84. Brandes, M., et al., *Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines*. *International Immunology*, 2000. **12**(9): p. 8.
85. Williams, I.R., *CCR6 and CCL20 Partners in Intestinal Immunity and Lymphorganogenesis*. *Annals New York Academy of Sciences*, 2006. **1072**: p. 52-61.
86. Chong, Y., et al., *Downregulation of CXCR5 in CD27- B Cells on HIV-1 Infected Patients*. *Journal of Medical Virology*, 2004. **73**: p. 362-367.
87. Widney, D.P., et al., *Serum Levels of the Homeostatic B Cell Chemokine, CXCL13, Are Elevated During HIV Infection*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005. **25**.
88. Cyster, J.G., *Homing of antibody secreting cells*. *Immunological Reviews*, 2003. **194**: p. 48-60.
89. Falkenhagen, K.M., et al., *B-Cells in Ocular Adnexal Lymphoproliferative Lesions Express B-Cell attracting Chemokine 1 (CXCL13)*. *American Journal of Ophthalmology*, 2005. **140**(2): p. 335-337.
90. Ebisuno, Y., et al., *The B Cell Chemokine CXC Chemokine Ligand 13/B Lymphocyte Chemoattractant Is Expressed in the High Endothelial Venules of Lymph Nodes and Peyer's Patches and Affects B cell Trafficking Across High Endothelial Venules*. *Journal of Immunology*, 2003. **171**: p. 1642-1646.
91. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. *Nature*, 2000. **406**: p. 309-314.
92. Calmon-Hamaty, F., et al., *Lymphotoxin a revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Research & Therapy*, 2011. **13**(4): p. 232.
93. Höpken, U.E., et al., *Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003. **76**.
94. Nagasawa, T., *CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4*. *Journal of Molecular Medicine* 2013. **92**: p. 7.
95. Melchers, F., A.G. Rolink, and C. Schaniel, *The Role of Chemokines in Regulating Cell Migration during Humoral Immune Responses*. *Cell*, 1999. **99**: p. 4.
96. Dotan, I., et al., *CXCL12 is an constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010. **16**(4): p. 583-592.
97. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. *Nature*, 1996. **382**: p. 5.
98. Luker, K.E., et al., *Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells* *Oncogene*, 2012. **31**(45).
99. Balabanian, K., et al., *The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**: p. 35760-35766.
100. Sanchez-Martin, L., P. Sanchez-Mateos, and C. Cabanas, *CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease*. *Trends in Molecular Medicine*, 2013. **19**(1): p. 10.
101. Schutyser, E., S. Struyf, and J.V. Damme, *The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003. **14**.

102. Ghadjar, P., et al., *The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer*. International Journal of Cancer, 2009. **125**: p. 5.
103. Wurbel, M.-A., et al., *The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9*. European Journal of Immunology, 2000. **30**: p. 262-271.
104. Pabst, O., et al., *Chemokine Receptor CCR9 Contributes to the Localization of Plasma Cells to the Small Intestine*. The Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**(3): p. 411-416.
105. Rowland, S.L., et al., *BAFF-R signalling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following BCR signalling*. Journal of Immunology, 2010. **185**(8): p. 4570-4581.
106. Varin, M.-M., et al., *B-cell tolerance breakdown in Sjögren's Syndrome: Focus on BAFF*. Autoimmunity Reviews, 2010. **9**(9): p. 604-608.
107. Poudrier, J., et al., *The AIDS Disease of CD4c/HIV Transgenic Mice Shows Impaired Germinal Centers and Autoantibodies and Develops in the Absence of IFN- γ and IL-6*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 173-185.
108. Cohen, K.W., et al., *HIV-1 Single-Stranded RNA Induces CXCL13 Secretion in Human Monocytes via TLR7 Activation and Plasmacytoid Dendritic Cell-Derived Type 1 IFN*. The Journal of Immunology, 2015. **194**: p. 2769-2775.
109. Naumann, U., et al., *CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11*. PLoS ONE, 2010. **5**(2).
110. Gerrits, H., et al., *Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice*. Genesis, 2008. **46**(5): p. 235-245.
111. Wang, H., et al., *The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12*. blood, 2012. **19**(2).
112. Humpert, M.-L., et al., *CXCR7 influences the migration of B cells during maturation*. European Journal of Immunology, 2014. **44**: p. 694-705.
113. Lee, A.Y.S., et al., *CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: odd couple or axis of evil?* Frontiers in Immunology, 2013. **4**.
114. Wurbel, M.-A., et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor $\gamma\delta$ + gut intraepithelial lymphocytes*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2626-2632.
115. Feng, L.-Y., et al., *Involvement of a Novel chemokine Decoy Receptor CCX-CKR in Breast Cancer Growth, Metastasis and Patient Survival*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(9): p. 2962-2970.
116. Badr, G., et al., *HIV Type 1 Glycoprotein 120 Inhibits Human B Cell Chemotaxis to CXCL12, CC Chemokine Ligand (CCL)20, and CCL21*. The Journal of Immunology, 2015. **175**: p. 302-310.

ANNEXES

Annexe 1:

Expression des récepteurs par chaque population B sélectionnée



Annexe 2:

HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans

Chagnon-Choquet J, Gauvin J, Roger J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M; Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups.

Statut: Publié dans Journal of Infectious Diseases, 15 avril 2015, volume 211, numéro 8, pages 1229-40. DOI: 10.1093/infdis/jiu611. (Publié en ligne: 6 novembre 2014)

Contribution des co-auteurs : Josiane Chagnon-Choquet a exécuté les analyses de quantification de Nef, la cytométrie en flux ainsi que les essais in vitro. JCC a également effectué l'analyse statistique des résultats et a participé à la rédaction de l'article. Julie Gauvin a participé aux analyses de quantification de RA sur les spécimens. Julien Roger a participé à la quantification de BLyS/BAFF dans les essais in vitro. Julie Fontaine a participé aux analyses de quantification de BLyS/BAFF sur les spécimens. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration de l'étude, a supervisé les expériences et a participé à la rédaction de l'article. Michel Roger a participé à la rédaction de l'article et a coordonné les différents aspects de l'étude.

HIV Nef promotes BLyS/BAFF expression by blood dendritic cells during the course of infection in humans

Josiane Chagnon-Choquet^{1,2}, Julie Gauvin^{1,2}, Julien Roger¹, Julie Fontaine^{1,2,3}, Johanne Poudrier^{1,2*}, Michel Roger^{1,2*} for the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups.

¹ Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, ² Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, ³ present address Charles Rivers Laboratories, Senneville, Canada.

*J.P. and M. R. are senior co-authors

Word count in the text: 3498

Running Title: HIV Nef promotes BLyS/BAFF expression

Number of figures and tables: Figures: 6, Table: 1, Supplemental Figures: 3

Reference count: 49

FOOTNOTE PAGE

Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by grants # CHR-126633 and # HB-134180 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). Josiane Chagnon-Choquet holds a Studentship from the Fondation Gabriel Marquis.

Part of this work was presented at the Keystone Symposium on B-cell Development and Function joint with HIV vaccines, February 10th-15th 2013, CO, USA.

The members of the Montreal Primary HIV Infection and Slow Progressor Study Groups are Anne Vassal and Mario Legault (coordinators); Jean Pierre Routy (principal investigator Primary HIV Study), Cécile Tremblay (principal investigator Slow Progressor Study), Réjean Thomas, Benoit Trottier, Sylvie Vézina, Louise Charest, Catherine Milne, Jason Friedman, Emmanuelle Huchet (Clinique médicale l'Actuel), Jean-Guy Baril, Pierre Côté, Bernard Lessard, Serge Dufresne, Marc-André Charron (Clinique médicale du Quartier Latin). Roger LeBlanc (Clinique médicale urbaine OPUS), Louise Labrecque, Danielle Rouleau, Claude Fortin, Marie Munoz, Julie Bruneau (UHRESS Hôtel-Dieu, Notre-Dame, St-Luc), Norbert Gilmore, Richard Lalonde, Martin Potter, Marina Klein, Alexandra de Pokomandy, Jason Szabo, Nicole Bernard (UHRESS thoracique & Hôpital général de Montréal)

Address correspondence to:

Johanne Poudrier PhD [REDACTED] and Michel Roger MD PhD

[REDACTED], CRCHUM, Tour Viger 900 rue St-Denis, Montréal, Canada
H2X 0A9. Phone: (514) 890-8000 (25798, 31263), Fax: (514) 412-7512.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) modulate B-cell survival and differentiation, mainly through production of growth factors such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). We have recently shown that in HIV-1-infected rapid and classic progressors B-cell dysregulations were associated with increased BLyS/BAFF expression in plasma and by blood myeloid DCs (mDCs), in contrast to aviremic slow progressors, also known as elite controllers. In previous work with HIV-transgenic mice, B-cell dysregulations were concomitant with altered mDCs and dependant on HIV negative factor (Nef). We now report that HIV-1-Nef is detected in plasma and BLyS/BAFF over-expressing blood mDCs of HIV-1-infected rapid and classic progressors, early on infection and despite successful therapy, whereas it is low to undetectable in aviremic slow progressors. In vitro, HIV-1-Nef drives monocyte-derived DCs towards BLyS/BAFF over-expression, through a process involving STAT1. Importantly, this is counteracted in presence of all-trans retinoic acid. Nef thus contributes to high BLyS/BAFF pro-inflammatory profiles in HIV-1-infected individuals.

Word count in abstract: 150

Keywords: Dendritic cells; B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF); HIV Nef

INTRODUCTION

B-cells are considered to be major players in the battle against HIV [1-7]. Unfortunately, most HIV-1-infected individuals present a dysregulated B-cell compartment, likely impeding efficient antiviral responses, and which is not fully restored by therapy [8, 9].

Dendritic cells (DCs) are involved in the outcome of B-cell development, differentiation and survival, mainly through production of factors such as B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF) [10-13]. DCs have been reported to be altered in number, phenotype and function in HIV-1 disease progression [14-17]. In previous longitudinal studies, we have shown altered DC frequencies in the blood of HIV-1-infected rapid (blood CD4⁺ T-cell counts below 250 cells/mm³ within 2 years of infection) and classic (blood CD4⁺ T-cell counts above 500 cells/mm³ after 2 years of infection) progressors [18], which correlated with increased serum levels of DC-tropic chemokines, suggesting drainage to peripheral sites [19]. Most importantly, these alterations were concomitant with B-cell dysregulations [20, 21] and increased BLyS/BAFF expression levels in the plasma and by mature blood myeloid DCs (mDCs) and CD11c⁺CD14⁺ monocytic DC precursors, beginning in the acute phase of infection and persisting despite successful therapy [20]. In contrast, HIV-1 slow progressors (HIV-infected individuals for more than 8 years with blood CD4⁺ T-cell counts above 500 cells/mm³ and low (viremic) or undetectable (aviremic or elite controllers) viral loads in absence of therapy) had normal blood BLyS/BAFF expression levels, and presented unaltered blood DC and B-cell compartments [18, 20].

In previous work with HIV-transgenic (Tg) mice [22], B-cell dysregulations were associated with altered mDCs [23, 24], likely involving delivery of “altered and/or excessive” factors such as BLyS/BAFF [23, 24], and were dependant on the viral accessory protein “negative factor” (Nef) [22, 25]. In humans, Nef has been known to play a critical role in HIV

disease progression, notably by boosting viral replication, enhancing infectivity and virus spread. Moreover, individuals infected with a nef mutated virus present slower disease progression [26-29]. Nef action includes reduction of host cell actin dynamics [30], as well as modulation of expression of cell-surface proteins such as HLAs, CD4 and chemokine receptors [26]. Nef has also been found to be released and has been measured in the blood of HIV-1-infected individuals, either soluble or within exosomes or microvesicles [31-33]. As such, Nef has been shown to penetrate and affect several cell populations [26], such as DC maturation and function [14]. STAT1-3 signalling paths have been shown to be used by Nef to promote a pro-inflammatory profile by human monocyte-derived macrophages [34-36] and likely over-expression of tumor necrosis factor (TNF)- α by human monocyte-derived DCs (Mo-DCs) [37]. Of note, high BLyS/BAFF levels were found in serum and on DCs of mice deficient for autoimmune-regulatory (AIRE), which is involved in regulation of STAT1 signalling [38, 39]. Interestingly, as for HIV-Tg mice [23, 24], AIRE-deficient mice present enlarged splenic marginal zones, B-cell hyperactivity and autoimmunity, a phenotype also shared by BLyS/BAFF-Tg mice [40]. Thus, Nef modulates STAT1-3 signalling, shown to be involved in BLyS/BAFF expression and release [41].

The battle against HIV largely occurs at mucosal sites of intrusion and propagation for the virus. There, DCs are of the earliest to be exposed to HIV, and present an inherent capacity to orchestrate a homeostatic balance between tolerance and protection [14-17]. The metabolism of vitamin A into retinoic acid in DCs is pivotal to modulation of mucosal immune homeostasis, notably by shaping B- and T-cell responses, through regulation of the activation of a number of transcription factors, such as STAT1 [42].

We now report that Nef contributes to the increased BLyS/BAFF expression levels found on mDC populations of viremic HIV-1-infected individuals, through a process involving STAT1. Importantly, in vitro studies demonstrate that Nef-mediated BLyS/BAFF over-expression is counteracted by retinoic acid.

METHODS

Subjects

Thirty male HIV-1-infected subjects were selected from the Montreal Primary HIV Infection cohort: 13 rapid and 17 classic progressors. The date of infection was estimated based on clinical and laboratory results using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program (NIAID, Bethesda, MD). Blood samples were taken in acute (0-3 months) and/or early (5-8 months) phases of infection, and 3-6 and 9-12 months after initiation of antiretroviral therapy (ART) for rapid progressors, and in the acute, early and chronic (24 months) phases of infection for classic progressors. Blood samples from 13 slow progressors (7 viremic and 6 aviremic) were obtained from the Montreal Slow Progressors cohort. Blood samples from 20 age- and sex-matched HIV-negative volunteers were obtained. HIV plasma viral loads and blood CD4⁺ T-cell counts were determined as reported [43]. None of the subjects had syphilis, hepatitis B or C. Written informed consent was obtained from all subjects, and research conformed to guidelines and was approved by the CRCHUM Ethics Review board.(project reference SL05.028).

Detection of HIV-1-Nef in blood mDC populations

Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were processed for flow-cytometry as reported [18, 20, 21]. We used Aqua-LIVE/DEAD exclusion Fixable Stain (Invitrogen/Life technologies, Eugene, OR, USA). Conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) used: APC-H7-anti-HLA-DR, PE-Cy7-anti-CD11c, FITC-anti-CD3, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD56 (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), AlexaFluor700-anti-CD14 (BioLegend, San Diego, CA, USA), PE-anti-BLyS/BAFF (eBioscience, San Diego, CA, USA). Biotinylated mouse anti-HIV-1-Nef mAb (Immunodiagnostics, Woburn, MA, USA) was followed by APC-streptavidin (BD-Biosciences). Intracellular labelling was using Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit (BD-Biosciences). Cells were fixed with 1.25% paraformaldehyde (PFA)/18 hours. Data acquisition of 10^5 events per sample was on LSRFortessa (BD-Biosciences), and analysis with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). All stainings were compared to fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Fluorescence compensation settings were optimized with anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads (BD-Biosciences) were used for LSRFortessa calibration.

Culture and stimulation of Mo-DCs.

PBMCs from healthy donors were isolated on Lymphoprep (Axis-Shield, Dundee, Scotland). Monocytes ($>95\%$ $CD14^+CD3^-CD19^-CD56^-$) were negatively enriched using immunomagnetic technology (Dynal-Invitrogen/Life technologies), and cultured at 5×10^5 cells/ml in Iscoves' Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin and 10^{-4} 2-Mercaptoethanol. Recombinant human IL-4 (100 ng/ml) and GM-CSF (250 ng/ml) (Invitrogen/Life technologies) were added on initiation and at 3 days of culture. After 6 days, Mo-DCs were 85-95% $HLA-DR^+CD11c^+$ and $CD14^-CD3^-CD19^-$

CD56⁺ by flow-cytometry. Recombinant soluble HIV-1-Nef (sNef) protein (1 µg/ml, NIH-AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS/NIAID, cat#11478) and/or all-trans retinoic acid (1 µM, Sigma-Aldrich) were added either on initiation and at 3 days of culture, and/or after 6 days of Mo-DC maturation, for 24 hours. LPS (2 µg/ml) and sNef signalling-defective mutant (sΔNef, 1 µg/ml, Jena Bioscience, Jena, Germany) were used as controls. sNef and sΔNef proteins were filtered with high-capacity endotoxin removal resin (Pierce-Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and tested endotoxin-free using Limulus Amebocyte Lysate assay (Lonza, Walkersville, MD, USA). For sNef blocking, mouse anti-Nef EH1mAb (1 µg/ml, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program from Dr. James Hoxie) was added at the same time as sNef to the Mo-DCs culture. On day 6 or 7, BrefeldinA (BD-Biosciences) was added for the last 6 hours of the culture period. Cells were processed for flow-cytometry analysis as mentioned above. Conjugated mouse anti-human mAbs used: PE-Cy7-anti-HLA-DR, APC-anti-CD11c, FITC-anti-CD86, PacificBlue-anti-CD16, AlexaFluor700-anti-TNF-α (BD-Biosciences), PE-anti-BLyS/BAFF (eBioscience). For detection of internalized and/or bound sNef, cells were fixed/permealized and labelled with mouse anti-Nef followed by FITC-goat anti-mouse IgG (BD-Biosciences). Flow-cytometry acquisition and analysis as mentioned above.

Determination of HIV-1-Nef, retinoic acid and BLyS/BAFF levels.

Plasma HIV-1-Nef and retinoic acid, and BLyS/BAFF in culture supernatants were measured using Immunodiagnostics, MyBioSource (San Diego, CA, USA), and R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) ELISA kits respectively.

Flow-Cytometry analysis of STAT1 phosphorylation.

Unstimulated day 6 Mo-DCs were incubated (37°C) at 1×10^5 cells/ml for 15, 30, 60 and 120 min with or without sNef (1 µg/ml) and/or retinoic acid (1µM). Cells were pre-incubated 30 min with STAT1 inhibitor fludarabine (50 µM, Sigma-Aldrich) and labelled with PE-conjugated mouse anti-human STAT1/(Y701) (BD-PhosFlow/BD-Biosciences). Flow-cytometry acquisition and analysis as mentioned above.

Statistical analyses.

Statistical significance of differences between groups was assessed with Fisher exact test for categorical variables, and unpaired Student's *t* test or one-way analysis of variance when continuous variables were normally distributed or with Mann-Whitney U test otherwise. Wilcoxon signed-rank test was used for pairwise comparisons of different phases of infection within each group. Spearman rank test was used to determine correlations between continuous variables. Analyses were performed using GraphPad PRISM5.0/Windows.

RESULTS

Socio-demographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals are shown in Table 1, and longitudinal assessment of blood CD4⁺ T-cell counts and viral loads are depicted in Figure 1A-1B. There was no significant correlation between blood CD4⁺ T-cell counts or viral loads and DC populations, Nef and retinoic acid levels studied here either within groups or among all subjects during early or chronic infection (data not shown).

Nef is detected in plasma and in blood mDCs and monocytic mDC precursors throughout the course of infection in HIV-1 progressors.

Because Nef cellular levels might be influenced by the fluctuations in DC population frequencies, data are expressed as percentages of Nef bearing cells within each population. As expected, Nef could not be detected in the plasma or in blood mDC populations of HIV-negative donors (Figures 1C, and 2B-2C, all panels). Relative frequencies of mDC and monocytic mDC precursors bearing Nef in HIV-1-infected rapid and classic progressors were significantly high throughout the course of infection (Figure 2B-2C, left and middle panels). Similarly, plasma Nef levels were also elevated in these individuals (Figure 1C, left and middle panels). Interestingly, plasma Nef levels remained elevated in rapid progressors despite significant reduction in plasma viral loads after initiation of ART (Figure 1B, left panel). Importantly, percentages of Nef bearing cells within blood mDC populations and plasma Nef levels of both viremic and aviremic slow progressors were either low or similar to those measured in HIV-negative donors (Figures 1C, and 2B-2C, right panels). However, the relatively small number of samples from the slow progressor groups may have reduced the power of the study to detect significant differences.

Nef is associated with BLyS/BAFF over-expression in plasma and by blood mDCs and mDC precursors of HIV-1-infected individuals.

Nef levels correlated significantly with those of BLyS/BAFF in the plasma of classic progressors during the acute phase of infection (Figure 3A). Surface expression of BLyS/BAFF by blood mDC populations was higher in cells bearing Nef when compared to those not bearing Nef (Figure 3B-3C). This is of particular importance for the monocytic mDC precursor population, where BLyS/BAFF levels were significantly higher in cells bearing Nef in all HIV-1-infected individuals, as soon as in the acute phase and throughout the course of infection, regardless of the rate of disease progression and ART.

Recombinant soluble Nef (sNef) increases levels of BLyS/BAFF and TNF- α expression by Mo-DCs.

To assess whether Nef contributes to the increased BLyS/BAFF expression levels found on mDC populations of HIV-1-infected individuals, day 6 Mo-DCs were stimulated in vitro with sNef for 24 hours. Unstimulated Mo-DCs, which were HLA-DR⁺CD11c⁺ and CD86⁺, expressed basic levels of BLyS/BAFF and TNF- α (Figure 4A, left panels). Mo-DCs stimulated with sNef presented no significant difference in HLA-DR and CD11c expression levels, but expressed increased levels of CD86 as did Mo-DCs stimulated for 24 hours with LPS (Figure 4B). Importantly, Mo-DCs stimulated with sNef had significant increased BLyS/BAFF and TNF- α expression levels (Figure 4C). Moreover, we found a significant increased percentage of a Mo-DC population expressing very high levels of BLyS/BAFF (BLyS/BAFF^{hi}) following stimulation with sNef or LPS (Figure 4D), which increased with

increment amounts of sNef (Figure 4E). When stimulated with both sNef and LPS, Mo-DCs had a similar increase in TNF- α expression and percentage of BLYS/BAFF^{hi} expressing cells to that obtained with either sNef or LPS used alone, but we observed a higher increase in BLYS/BAFF expression levels (Figure 4C-4D). Mo-DCs cultured for 6 days with sNef also had higher TNF- α expression levels when compared to unstimulated Mo-DCs (Supplementary Figure 1), and increased BLYS/BAFF levels were measured in cell culture supernatants (Figure 4F).

To confirm that sNef can bind and likely penetrate Mo-DCs, unstimulated cells were collected at day 6 and incubated with sNef for periods of 1 and 6 hours. After an exposition to sNef for 1 hour, it was possible to detect an accumulation of sNef by flow-cytometry, but the signal was not detectable after 6 hours (Supplementary Figure 2A).

To assess whether the effect of sNef on the increased BLYS/BAFF and TNF- α expression observed in Mo-DCs was specific to sNef, an anti-Nef antibody was added to day 6 Mo-DC cultures in presence or absence of sNef, for 24 hours. The sNef effect on BLYS/BAFF expression levels by Mo-DCs was blocked by the addition of anti-Nef in a dose-dependent manner (Figure 4G). The anti-Nef antibody did not affect the Mo-DCs profile nor their BLYS/BAFF and TNF- α expression levels when cultured without sNef (Supplementary Figure 2B-D). The same culture set-up using an isotype matched control antibody had no effect on BLYS/BAFF and TNF- α expression levels (Supplementary Figure 2B-D). To further confirm sNef specific effect, s Δ Nef, which is a sNef signalling-defective mutant, was added for 24 hours in day 6 Mo-DC cultures. As expected, s Δ Nef stimulation significantly reduced the percentage of BLYS/BAFF^{hi} expressing cells when compared to sNef stimulation (Figure 4H).

We have assessed whether the effect of sNef on BLYS/BAFF expression by Mo-DCs involved STAT1. As such, sNef promoted a Y-hyperphosphorylated STAT1 pattern following 15 minutes incubation with Mo-DCs (Figure 4I), and this was reduced in presence of STAT1 inhibitor fludarabine (Figure 4J). Fludarabine also reduced the sNef mediated increased BLYS/BAFF expression profile (Figure 4K).

The effect of sNef on BLYS/BAFF over-expression by Mo-DCs is counteracted by retinoic acid.

Deriving Mo-DCs in presence of retinoic acid affected the DC maturation profile. Accordingly, it has been demonstrated that retinoic acid promotes an anti-inflammatory profile by DCs [44]. Indeed, Mo-DCs derived for 6 days with retinoic acid presented significantly lower HLA-DR and CD86 surface expression levels when compared to Mo-DCs derived without retinoic acid (Figure 5A). However, the viability and percentage of CD11c⁺HLA-DR⁺ Mo-DCs obtained after 6 days of culture were unaffected by retinoic acid (data not shown). Importantly, BLYS/BAFF expression was also significantly lower when Mo-DCs were derived in presence of retinoic acid (Figure 5B, upper panel). We also found a trend for lower TNF- α expression levels as well as lower percentages of BLYS/BAFF^{hi} Mo-DCs in cultures containing retinoic acid (Figure 5B, lower panel, and 5C respectively). Mo-DCs derived in absence of retinoic acid did not modulate their BLYS/BAFF or TNF- α expression levels following 24 hours incubation with retinoic acid (Figure 5D-5E). Importantly, the increased BLYS/BAFF and TNF- α expression levels by Mo-DCs stimulated 24 hours with sNef alone (Figure 4C-D) were not observed in presence of retinoic acid (Figures 5D-5F and Supplementary Figure 3A). Concomitantly, as shown in Figure 5G, STAT1 Y-

hyperphosphorylation modulated by sNef in Mo-DCs, was not significantly observed with retinoic acid. Also, sNef did not promote BLYS/BAFF and TNF- α expression by Mo-DCs which had been derived in presence of retinoic acid (Supplementary Figure 3B-D).

Given our observations with retinoic acid *in vitro*, we have longitudinally measured plasma retinoic acid levels of HIV-1-infected individuals and compared them to healthy donors. We found that retinoic acid levels were significantly increased following therapy in rapid progressors (Figure 6, left panel). Importantly, plasma retinoic acid levels of aviremic slow progressors were significantly lower when compared to healthy donors (Figure 6, right panel).

DISCUSSION

Nef levels in the blood of HIV-1-infected individuals may be indicative of disease progression and viral reservoir status. Indeed, Nef remained elevated in both the plasma and in blood mDCs and mDC precursors of rapid and classic progressors, as soon as in the acute phase of infection, throughout chronicity and after successful therapy. The Nef we detected in plasma is likely to represent mostly its soluble form, as the samples were not processed to measure Nef associated with microvesicles [33]. It is unlikely that Nef detected within mDC populations reflects the extent of infected cells, as soluble Nef can bind/penetrate this cell type [14]. These observations are in sharp contrast to that observed with HIV-1-infected slow progressors, in which Nef levels were low to undetectable. Therefore it appears that control of disease progression is associated with low to undetectable Nef levels in plasma and blood mDC populations. These findings are in agreement with previous observations showing that these HIV-1-infected slow progressors have relatively preserved blood DC and B-cell compartments

with low-inflammatory and BLyS/BAFF expression patterns [20, 21]. On the other hand, the presence of high Nef blood levels in HIV-1-infected rapid and classic progressors might contribute to the altered DC compartment [18], pro-inflammatory profile and BLyS/BAFF over-expression status, all of which is concomitant with B-cell dysregulations previously observed in these individuals [20, 21].

Nef has been reported to penetrate DCs in vitro and to alter their maturation and function, and to induce distinct cytokine/chemokine secretion patterns [14]. Accordingly, our observations suggest that sNef penetrates Mo-DCs and upregulates BLyS/BAFF and TNF- α expression. Although Nef plasma levels were in the range of 1-6 ng/ml, the effects of sNef were significant only at higher doses (1 μ g/ml), which we speculate could be reached in tissues or in close proximity to the source of the Nef protein. While the net impact of sNef on BLyS/BAFF and TNF- α cell expression is modest, the differences are quite significant. These are in line with findings showing Nef-mediated TNF- α over-expression by human Mo-DCs [37]. Importantly, our observations support the notion that Nef detected within blood mDCs and mDC precursors of viremic HIV-1-infected individuals directly contributes to their high BLyS/BAFF pro-inflammatory profile, early on infection and lasting throughout disease progression despite therapy. Although we found that Nef may be directly involved in this process, the overall inflammatory context as well as elements of microbial translocation, such as LPS, have been measured in the plasma of these individuals [20] and likely also contribute to their BLyS/BAFF expression status. As such, we found LPS to also modulate BLyS/BAFF expression levels of Mo-DCs in vitro, and moreover LPS and sNef synergized for even greater BLyS/BAFF expression levels.

The effects of Nef on BLyS/BAFF expression levels are likely to result from its capacity to hijack the cellular signalling machinery, as demonstrated by the hyper-tyrosine phosphorylation of STAT1 following incubation of Mo-DCs with sNef. This is consistent with that reported for human monocyte-derived macrophages, where Nef has been shown to interact with TNF receptor associated factor (TRAF)-2, and manipulate both TRAF/NF- κ B and TRAF/IRF-3 signalling paths [45], thereby promoting a pro-inflammatory profile and STAT1-3 activation [34, 35]. Interestingly, we demonstrate that the effect of sNef on BLyS/BAFF expression status of Mo-DCs is counteracted by retinoic acid, which prevented sNef mediated STAT1 hyperphosphorylation. These observations are consistent with the low-expression profile of HLA-DR and CD86 as well as BLyS/BAFF and TNF- α we found for Mo-DCs derived with retinoic acid, and with the report demonstrating that signals delivered via receptors for retinoic acid may be anti-inflammatory and promote a “tolerogenic” profile [46]. Retinoic acid regulates several nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), induced during Mo-DC development and which are potent regulators of inflammation [44].

The capacity of retinoic acid to counteract the effects of sNef on BLyS/BAFF over-expression by Mo-DCs suggest that the metabolism of vitamin A in DCs is likely to be of prime importance in the battle against HIV. A process mainly taking place at mucosal sites, where retinoic acid is pivotal to regulation of mucosal immune homeostasis [42]. The latter, which we find to be altered in the context of HIV-1 disease progression, as revealed by the elements of microbial translocation measured in the blood of rapid and classic progressors [20]. Retinoic acid plasma levels increased significantly 3 to 12 months after therapy in HIV-infected rapid progressors. This is probably due to the protease inhibitor-containing ART

regimen they were taking. Indeed, protease inhibitors can enhance retinaldehyde dehydrogenase activity and/or gene expression leading to increased retinoic acid plasma concentrations in patients under protease inhibitor-containing ART regimens [47]. Also, in a recent study, monocytes isolated from HIV-infected patients expressed altered patterns of nuclear receptors, characterized by a profound reduction in the expressions of retinoic acid and PPAR receptors. Of interest, this was not restored under therapy and was linked to an altered expression of genes which supports both an immune activation and altered lipid metabolism [48].

Interestingly, we found retinoic acid plasma levels to be lower in aviremic slow progressors when compared to healthy donors. Whether this is a genetic benefit and/or linked with active mucosal control remains to be established. Nevertheless, this finding may suggest that the capacity to maintain low retinoic acid levels at the systemic level is beneficial to the host. Overall, these suggest that the capacity to maintain a certain immune homeostasis at mucosal sites allows for better control of inflammation and disease progression.

CONCLUSION

Incomplete therapeutic restoration of immune competence and sustained chronic inflammation may be related to persistence of Nef, which likely results from HIV-1 reservoirs, and can be released systemically, independently of viral replication [49]. Exploring the effects that blocking of Nef and/or excess BLyS/BAFF and the metabolism of vitamin A have on the immune/inflammatory context associated with HIV-1 will likely benefit to therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the participants of the Montreal PHI and Slow Progressors study groups. We also thank Dr Dominique Gauchat, Christian Charbonneau and Jean-François Trudel for invaluable flow-cytometry, bio-imaging and imaging expertise, respectively. Marie-Pierre Boisvert, Maryse Lainesse, Rebecca Bordi, Véronique Lafontaine, Bader Yassine-Diab and Younes Chouick for processing the blood samples. We are grateful to all our healthy volunteers for blood donations. The authors declare no conflict of interest.

This work was supported by grant # CHR-126633 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). Josiane Chagnon-Choquet holds a Studentship from the Fondation Gabriel Marquis.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS JCC performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. JG performed the plasma retinoic acid measurements. JR performed the supernatants BLYS/BAFF measurements. JF performed the plasma BLYS/BAFF measurements. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

REFERENCES

1. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of Dendritic cells on B-cell Responses during HIV Infection. *Clin Dev Immunol* **2012**; doi:10.1155/2012/592187.
2. Borrow P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* **2011**; 6(5): 353–363.
3. McElrath MJ. Standing Guard at the Mucosa. *Immunity* **2011**; 34: 146-148.
4. Tomaras GD, Haynes BF. Strategies for eliciting HIV-1 inhibitory antibodies. *Curr Opin HIV and AIDS* **2010**; 5:421–427.
5. Tudor D, Derrien M, Diomede L, et al. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol* **2009**; 2: 412-426.
6. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* **2011**; 34: 269-280.
7. Gaudet RG, Breden F, Plummer F, Berry JD. Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV resistant individual. *MAbs* **2011**; 3:181-191.
8. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* **2009**; 9: 235-245.
9. Poudrier J, Roger M. Dendritic Cell Status Modulates the Outcome of HIV-Related B Cell Disease Progression. *PLoS Pathog* **2011**; 7(8): e1002154. doi:10.1371/journal.ppat.1002154.

10. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **2009**; 9: 15-27.
11. Macpherson G, Kushnir N, Wykes M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev* **1999**; 172: 325-34.
12. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, [Saulep D](#), [Mackay F](#), Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmunity Rev* **2010**; 9(9):604-8.
13. Cerutti A, Puga I, Cols M. Innate control of B cell responses. *Trends in Immunol* **2011**; 32(5):202-211.
14. Derby N, Martinelli E, Robbiani M. Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* **2011**; 6: 379–384.
15. van der Vlist M, van der Aar AMG, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells. *Curr Opin HIV AIDS* **2011**; 6: 348–352.
16. Smed-Soënsen A, Loré K. Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* **2011**; 6: 405–410.
17. Blanchet F, Moris A, Mitchell JP, Piguet V. A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4R T cells. *Curr Opin HIV AIDS* **2011**; 6: 391–397.
18. Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, Roger M. HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* **2009**; 199: 1007-1018.

19. Fontaine J, Poudrier J, Roger M. Persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19 and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2011**; 27:655-657.
20. Fontaine J, Chagon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. High expression levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans. *Blood* **2011**; 117: 145-155.
21. Chagnon-Choquet J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. IL-10 and Lymphotoxin- α Expression Profiles within Marginal Zone-like B-cell Populations are Associated with Control of HIV-1 Disease Progression. *PLoS ONE* **2014**; 10.1371/journal.pone.0101949
22. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **1998**; 95: 163-175.
23. Poudrier J, Weng X, Kay DG, et al. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN- γ and IL-6. *Immunity* **2001**; 15: 173-185.
24. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells. *J Virol* **2003**; 77: 11733-11744.
25. Hanna Z, Weng X, Kay DG, Poudrier J, Lowell C, Jolicoeur P. The Pathogenicity of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Nef in CD4C/HIV Transgenic Mice Is Abolished by Mutation of Its SH3-Binding Domain, and Disease Development Is Delayed in the Absence of Hck. *J Virol*. **2001**; 75(19):9378-92.
26. Laguette N, Bregnard C, Benichou S, Basmaciogullari S. Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med* **2010**; 31(5):418-33.

27. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **1995**; 270(5238):988-991.
28. Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **1991**; 65(4):651-662.
29. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* **1995**; 332(4):228-232.
30. [Stolp b](#), [imle a](#), [coelho fm](#), et al. Hiv-1 nef interferes with t-lymphocyte circulation through confined environments in vivo. [Proc natl acad sci u s a](#). **2012**; 6; 109(45):18541-6.
31. Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble NEF antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Letters* **1996**; 393: 93-96.
32. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**; 100(19):10592-10597
33. Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB. HIV Type 1 Nef Is Released from Infected Cells in CD45 β Microvesicles and Is Present in the Plasma of HIV-Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2011**; 27(2):167-178.
34. Federico M, Percario Z, Olivetta E, et al. HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood* **2001**; 98: 2752-2761.
35. Mangino G, Percario ZA, Fiorucci G, et al. In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant NEF of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, IkappaB kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *J Virol* **2007**; 81: 2777-2791.

36. [Percario z](#), [olivetta e](#), [fiorucci g](#), et al. Human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) nef activates stat3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of nef domains interacting with the cell endocytotic machinery. [J leukoc biol](#). **2003**; 74(5):821-32.
37. Quaranta MG, Tritarelli E, Giordani L, Viora M. HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4 (+) T cell activation. *Exp Cell Res* **2002**; 275: 243-254.
38. Hässler S, Ramsey C, Karlsson MC, et al. AIRE-deficient mice develop haematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* **2006**; 108:1941-1948.
39. Lindh E, Lind SM, Lindmark E, et al. AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105: 18466-18471.
40. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev* **2010**; 237(1):205-225.
41. Kim KS, Park J-Y, Park SM. Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia. *J Leuko Biol* **2009**; 86:349-359.
42. S Manicassamy S, B Pulendran B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Seminars in Immunol* **2009**; 21:22–27.
43. Mercier F, Boulassel MR, Yassine-Diab B, et al. Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Clin Exp Immunol* **2008**; 152: 72-80.
44. Szatmari I, Nagy L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells

connects lipids, the genome and immune function. *EMBO* **2008**; 27:2353–2362.

45. Mangino G, Percario ZA, Fiorucci G, et al. HIV-1 Nef Induces Proinflammatory State in Macrophages through Its Acidic Cluster Domain: Involvement of TNF Alpha Receptor Associated Factor 2. *PLoS ONE* **2011**; 6(8): e22982. doi:10.1371/journal.pone.0022982

46. Wojtal KA, Wolfram L, Frey-Wagner I, et al. The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. *Toxicology in Vitro* **2013**; 27:1525–1532

47. Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV. HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* **2001**; 15:1979-1984

48. Renga B, Francisci D, D'Amore C, et al. HIV-1 infection is associated with changes in nuclear receptor transcriptome, pro-inflammatory and lipid profile of monocytes. *BMC Infectious Diseases* **2012**; 12:274-280.

49. Chompre G, Cruz E, Maldonado L, Rivera-Amill V, Porter JT, Noel RJ Jr . Astrocytic expression of HIV-1 Nef impairs spatial and recognition memory. *Neurobiology of Disease* **2013**; 49: 128–136

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-1-infected individuals

Characteristics	Viremic				<i>P</i>
	Rapid	Classic	slow	Aviremic slow	
	progressors	progressors	progressors	progressors	
	(n = 13)	(n = 17)	(n = 7)	(n = 6)	
Age at first visit (years)	34 ± 7	38 ± 8	46 ± 9	44 ± 9	0.005 ^a
Sex (male/female)	12/1	17/0	7/0	3/3	0.005
Race (white/other)	12/1	16/1	6/1	5/1	NS
Route of transmission	8/5	16/1	6/1	3/3	0.05
CD4+ T cells/mm³					
Acute phase	533 ± 140	781 ± 213	na	na	0.002
Early phase	446 ± 40	714 ± 46	na	na	0.0008
Chronic phase	443 ± 193	629 ± 244	562 ± 122	888 ± 122	0.01 ^b
Nadir	254 ± 118	432 ± 140	506 ± 129	506 ± 175	0.0005 ^c
Viremia, x 10³ copies/ml^d					
Acute phase	366 ± 705	76 ± 126	na	na	NS
Early phase	121 ± 186	71 ± 190	na	na	NS
Chronic phase	7.65 ± 15.3	37.7 ± 62.3	3.01 ± 1.86	< 0.05 ^d	0.003 ^e
Peak	570 ± 808	202 ± 236	8.5 ± 6.5	0.065 ± 0.027	0.0001 ^f

Age, CD4 and viremia are expressed as mean ± SD. Sex, race and route of transmission were compared using Fisher exact test. Pairwise comparisons of CD4 and viremia for early phases were performed using unpaired Student's *t* tests. Comparisons among all groups (age at first visit, CD4, viremia in the chronic phase, nadir CD4) were performed with the one-way analysis of variance test. MSM, men who have sex with men; n, numbers; NS, not significant; na, not available.

^aP = 0.004 and 0.05 for the comparison of age between rapid and viremic slow progressors, and classic and viremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^bP = 0.0079 for the comparison of CD4+ T cells/mm³ in chronic phase between rapid progressors and aviremic slow progressors, as determined by the Mann-Whitney test.

^cP = 0.0008 and 0.001 and 0.02 nadir CD4 for the comparison between rapid and classic progressors, rapid and viremic slow progressors, and rapid and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^dFifty copies/ml corresponds to the detection threshold of the viral load test.

^eP = 0.002 and 0.002 for the comparison of viremia in chronic phase between classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

^fP = 0.006, 0.0007, 0.0005, 0.0004 and 0.001 for the comparison of peak viremia between rapid progressors and viremic slow progressors, rapid progressors and aviremic slow progressors, classic progressors and viremic slow progressors, classic progressors and aviremic slow progressors, and viremic and aviremic slow progressors, respectively, as determined by the Mann-Whitney test.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Longitudinal variations of CD4⁺ T-cell counts, viral loads and levels of Nef in the blood of HIV-1-infected individuals. (A) Blood CD4⁺ T-cell counts (cell/mm³) were determined by flow-cytometry in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). (B) Viral loads (log copies/ml) were quantified by in vitro signal amplification nucleic acid probe assay of HIV-1 RNA (bDNA) in the plasma of rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). (C) Plasma Nef concentrations (ng/ml) were quantified by ELISA in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). Cell populations, viral loads and plasma Nef concentrations were compared using the Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Significance levels are shown as * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 2. Detection of Nef in blood myeloid dendritic cell (mDC) populations of HIV-1 infected individuals. (A) Cells were gated on total live peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) followed by exclusion of LIN (CD3, CD19, CD56)⁺ populations. Cells were then discriminated upon CD14 expression and selected for HLA-DR and CD11c expression. Monocytic mDC precursors were determined as LIN⁻CD14⁺HLA-DR⁺CD11c⁺ and mDCs as LIN⁻CD14⁻HLA-DR⁺CD11c⁺. Quadrants are set based on FMO and isotype controls. Extracellular and/or intracellular Nef was then characterized in these populations. Measurement of background Nef in HIV-negative donors was subtracted from measurements

of all HIV-1 infected individuals for statistical analysis. Relative percentages of (B) mDC and (C) monocytic mDC precursors bearing Nef in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). The same values for HIV-negative donors in the left, middle and right panels are used as a control group. Cell population frequencies were compared using the Wilcoxon signed-rank test and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Data shown are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 3. BLyS/BAFF expression by blood myeloid dendritic cells (mDCs) and monocytic mDC precursors bearing HIV-1 Nef. (A) Spearman correlation between plasma BLyS/BAFF and Nef concentrations within the 0-3 months postinfection stage of classic progressors. (B) Fold-increase of BLyS/BAFF expression levels by mDCs (LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ CD14⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺) bearing HIV-1 Nef over that of mDCs not bearing HIV-1 Nef, in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel) and slow progressors (right panel). (C) Fold-increase of BLyS/BAFF expression levels by monocytic mDC precursors (LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ CD14⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁺) bearing HIV-1 Nef over that of mDC precursors not bearing HIV-1 Nef, in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel) and slow progressors (left panel). (B-C) Data are represented as mean \pm SEM, and compared to a fold-increase of one. Membrane BLyS/BAFF expression levels were determined with geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) by flow-cytometry. The fold-increase in BLyS/BAFF expression levels were compared using the

unpaired Student's *t* test within each phase of infection and within each study group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy.

Figure 4. Effect of recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) on BLyS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured with recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺LIN(CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow-cytometry analysis (FACS). Mo-DCs were stimulated for 24 hours with/without sNef (1 µg/ml) and/or LPS (2 µg/ml), and processed for FACS. (A) Representative dot plots show live gate on HLA-DR⁺CD11c⁺ Mo-DCs and analysis for BLyS/BAFF and TNF-α expression patterns by Mo-DCs cultured in medium alone (left panels) or with sNef (right panels). Quadrants are set based on FMO and isotype controls. (B-D) Ten independent experiments are cumulated in histograms showing: (B) HLA-DR (left panel), CD11c (middle panel), CD86 (right panel), (C) BLyS/BAFF (left panel) and TNF-α (right panel) fold-increase expression levels, as determined by geometric mean fluorescence intensity (geoMFI), when cultured with sNef and/or LPS over that of medium alone. (D) Fold-increase frequencies of BLyS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs cultured with sNef and/or LPS over that of medium alone. (E) Fold-increase frequencies of BLyS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs cultured with titrating amounts of sNef (1-1000 ng/ml) over that of medium alone (n=3). (B-E) Level for medium is adjusted to 1, and data are compared to a fold-increase of 1. (F) Soluble BLyS/BAFF concentrations (pg/ml) in day-6 Mo-DCs supernatants, cultured with/without sNef, were quantified by ELISA

(n=10). (G) Dot plots represent BLyS/BAFF and TNF- α expression patterns by live day-6 HLA-DR⁺CD11c⁺ Mo-DCs cultured for 24 hours with sNef (1 μ g/ml, left panel), and anti-Nef antibody (1 μ g/ml, middle panel; 5 μ g/ml, right panel) (n=3). (H) Fold-increase frequencies of BLyS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs cultured with sNef or recombinant soluble HIV-1-Nef signalling-defective mutant (s Δ Nef, 1 μ g/ml) over that of medium alone (n=3). (I) Fold-increase frequencies of STAT1-tyrosine(Y701) phosphorylation, assessed by FACS, of day-6 Mo-DCs incubated in presence/absence of (I) sNef for 15 min over that of 0 min (n=4), and (J) sNef and/or STAT1 inhibitor fludarabine for 15 min over that of sNef (n=3) (30, 60, 120 min not shown). (K) Fold-increase frequencies of BLyS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs cultured with sNef and/or fludarabine over that of sNef (n=3). (I-K) Data are compared to a fold-increase of 1. Statistical analyses were done using the unpaired Student's *t* test.

Figure 5. Effect of retinoic acid on BLyS/BAFF expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured in presence of recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days, with/without RA (1 μ M). Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺ LIN (CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow-cytometry analysis (FACS). (A-D) Six independent experiments are cumulated in histograms showing: (A) HLA-DR (upper panel), CD11c (middle panel), CD86 (lower panel), (B) BLyS/BAFF (upper panel) and TNF- α (middle panel) fold-increase expression levels, as determined by geometric mean fluorescence intensities (geoMFI), when cultured in presence of RA vs medium alone. (C) Fold-increase frequencies of BLyS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs cultured

with/without RA for 6 days. (D) Day-6 Mo-DCs derived without RA were stimulated for 24 hours with/without sNef (1 μ g/ml) and/or RA (1 μ M). Representative dot plots show live gate on HLA-DR⁺CD11c⁺ Mo-DCs and analysis for BLYS/BAFF and TNF- α expression patterns by Mo-DCs cultured with either medium alone (upper left panel), sNef (upper right panel), RA (lower left panel) or both sNef and RA (lower right panel). Quadrants are set based on FMO and isotype controls. Cumulative histograms show (E) BLYS/BAFF fold-increase expression levels as determined by geoMFI, and (F) fold-increase frequencies of BLYS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs, when cultured with/without sNef and/or RA for 24 hours over that of medium alone (sNef, n=10; RA and sNef+RA, n=3). (G) Fold-increase frequencies of STAT1-tyrosine(Y701) phosphorylation, as assessed by FACS analysis of day-6 Mo-DCs incubated with/without sNef and/or RA for 15 min over that of 0 min (30, 60, and 120 min not shown) (n=4). (E-G) Data are compared to a fold-increase of 1. Statistical analyses were done using the unpaired Student's *t* test. RA, retinoic acid.

Figure 6. Plasma retinoic acid concentrations. Plasma RA concentrations (ng/ml) were quantified by ELISA in rapid progressors (left panel), classic progressors (middle panel), and slow progressors (right panel). RA concentrations were compared using the Wilcoxon matched pair test and Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of different phases of infection within each group and between the study groups, respectively. Significance levels are shown as * *p* < 0.05. PI, postinfection; ART, antiretroviral therapy; RA, retinoic acid.

Supplementary Data

Supplementary Figure 1. Effect of recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) 6-days stimulation on TNF- α expression by monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured with recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days, in presence or absence of sNef at 1 μ g/ml. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺LIN(CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow-cytometry analysis (FACS). Mo-DCs were subsequently processed for FACS. Data are representative of 3 independent experiments which are cumulated in histograms showing TNF- α fold-increase expression level, as determined by geometric mean fluorescence intensity (geoMFI), when cultured for 6 days with sNef over that of medium alone. Level for medium is adjusted to 1, and data are compared to a fold-increase of 1. Statistical analyses were done using the unpaired Student's *t* test.

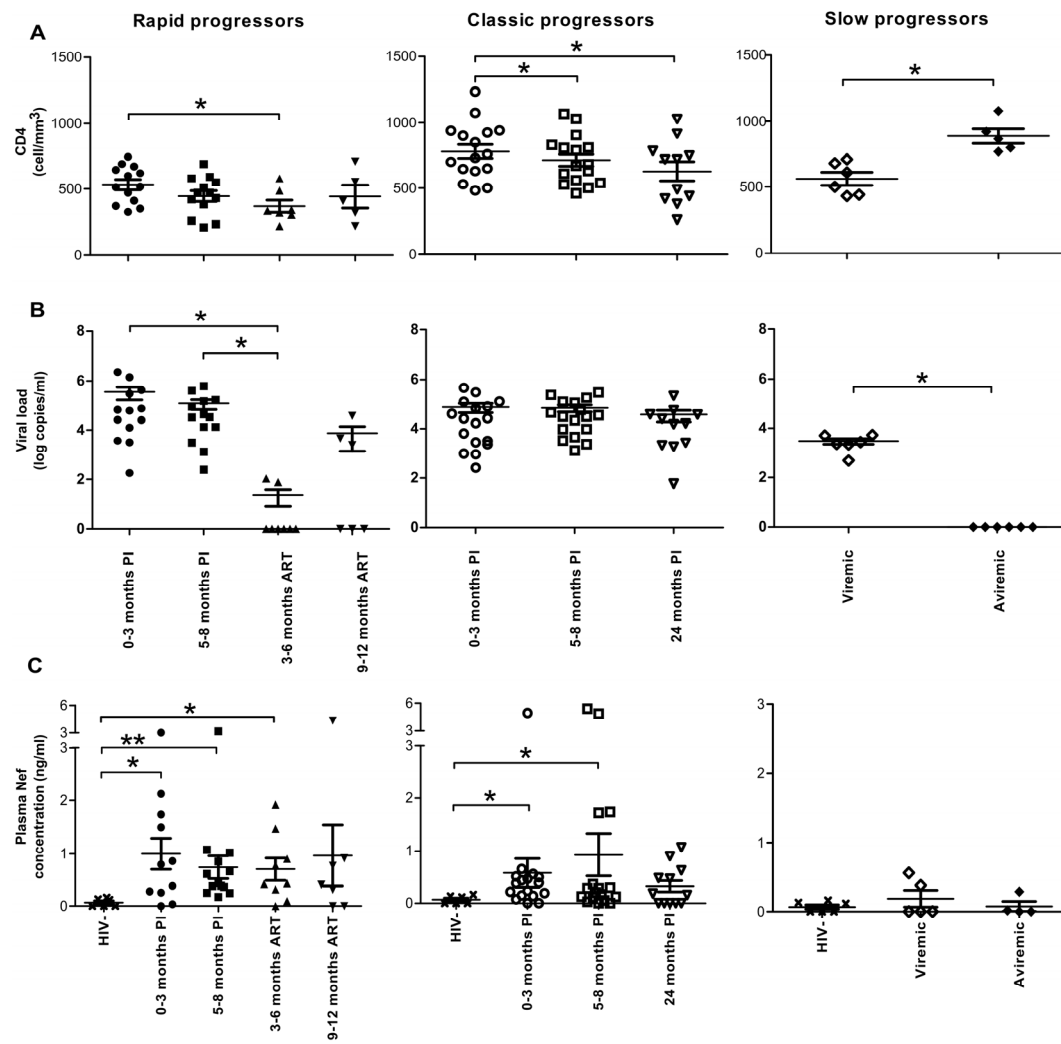
Supplementary Figure 2. Detection of recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) in monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs) and usage of an anti-Nef antibody for blocking sNef effect on Mo-DCs. CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured with recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺LIN(CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow-cytometry analysis (FACS). (A) Dot plots show Nef detection in live day-6 HLA-DR⁺CD11c⁺ Mo-DCs incubated in medium alone (left panel) or with sNef at 1 μ g/ml for 1 hour (middle panel) or for 6 hours (right panel) (n=3). (B-D) Mo-DCs were stimulated or not for 24 hours either with sNef (1 μ g/ml), and/or anti-Nef (1 μ g/ml,

5 µg/ml) and/or an irrelevant IgG antibody (1 µg/ml). Mo-DCs were then processed for FACS. (B) Fold-increase frequencies of BLYS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs when cultured with sNef, and/or anti-Nef, and/or anti-IgG, over that of medium alone. (C) BLYS/BAFF and (D) TNF-α fold-increase expression levels, as determined by geometric mean fluorescence intensity (geoMFI), when cultured with sNef, and/or anti-Nef, and/or anti-IgG, over that of medium alone. Level for medium is adjusted to 1, and data are compared to a fold-increase of 1.

Supplementary Figure 3. Effect of retinoic acid and recombinant soluble HIV-1 Nef (sNef) on monocyte derived dendritic cells (Mo-DCs). CD14⁺ monocytes were negatively enriched from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor and cultured in presence of recombinant human GM-CSF and IL-4 for 6 days, with or without RA at 1 µM. Cells recovered were 85-95% HLA-DR⁺CD11c⁺LIN(CD3, CD19, CD56)⁻ as assessed by multicolour flow-cytometry analysis (FACS). Mo-DCs were then stimulated or not for 24 hours with sNef (1 µg/ml) and/or RA 1 µM, and processed for FACS. (A) Cumulative histograms show TNF-α fold-increase expression levels as determined by geometric mean fluorescence intensities (geoMFI), when cultured in presence vs absence of sNef and/or RA for 24 hours over that of medium alone (sNef, n=10; RA and sNef+RA, n=3). (B-D) Four independent experiments are cumulated in histograms showing: (B) fold-increase frequencies of BLYS/BAFF^{hi}-expressing Mo-DCs, (C) BLYS/BAFF and (D) TNF-α fold-increase expression levels, as determined by geoMFI, when derived for 6 days in presence of RA and stimulated for 24 hours with sNef vs medium alone. Level for medium is adjusted to 1, and

data are compared to a fold-increase of 1. Statistical analyses were done using the unpaired Student's *t* test. RA, retinoic acid.

Figure 1



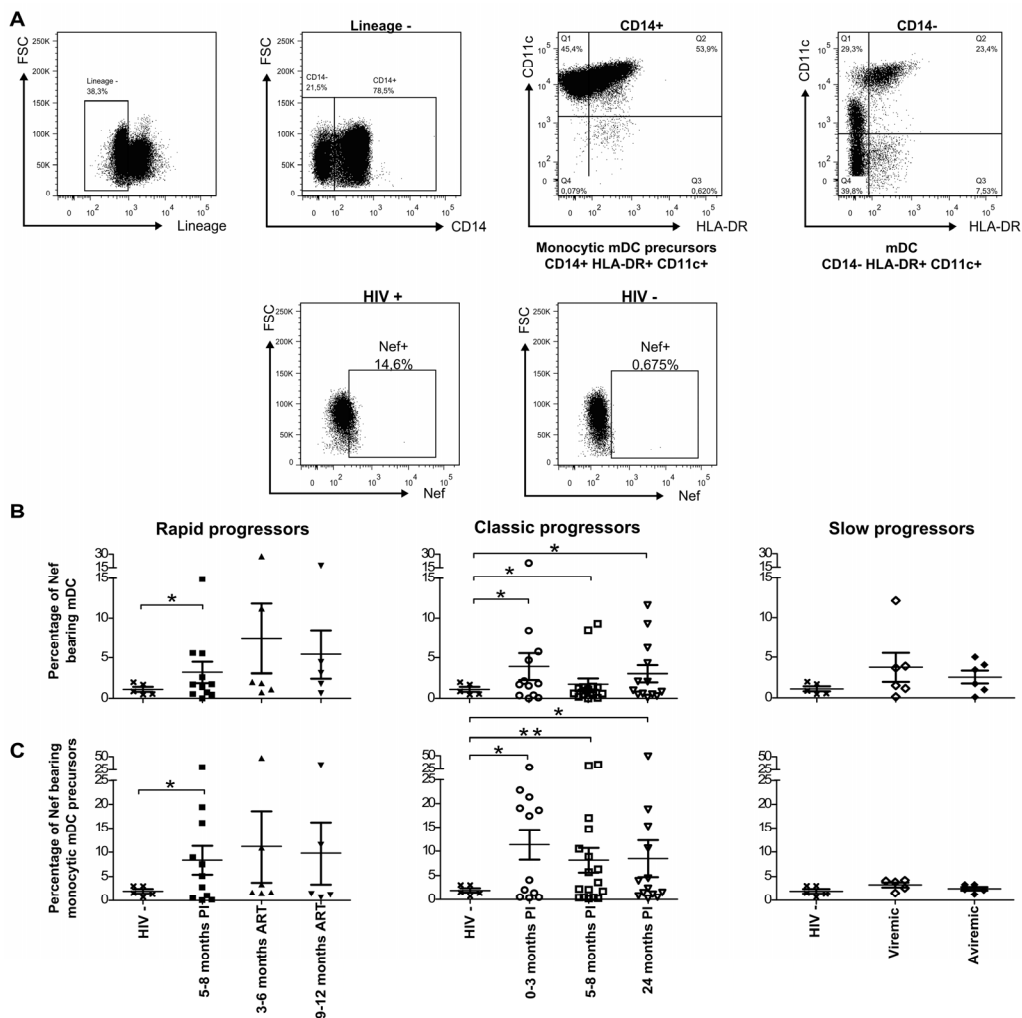


Figure 2

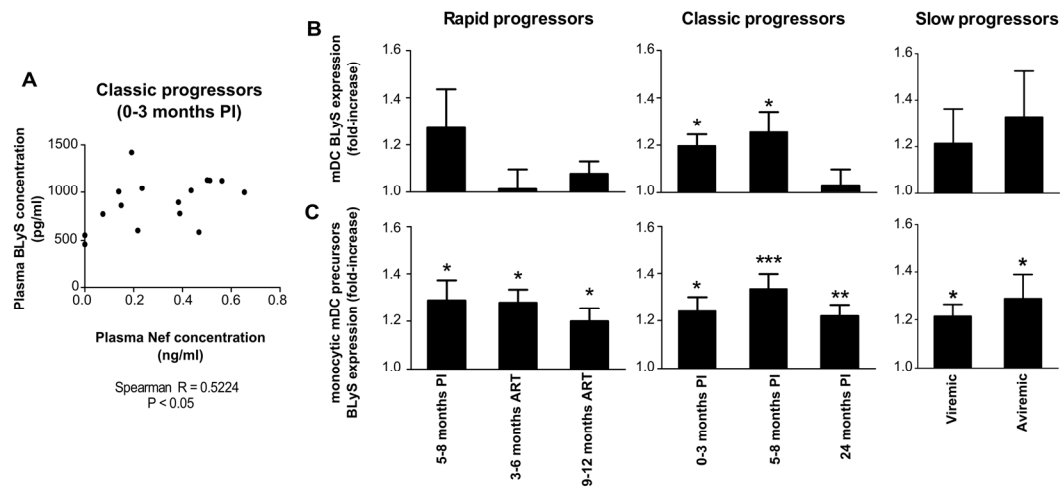


Figure 3

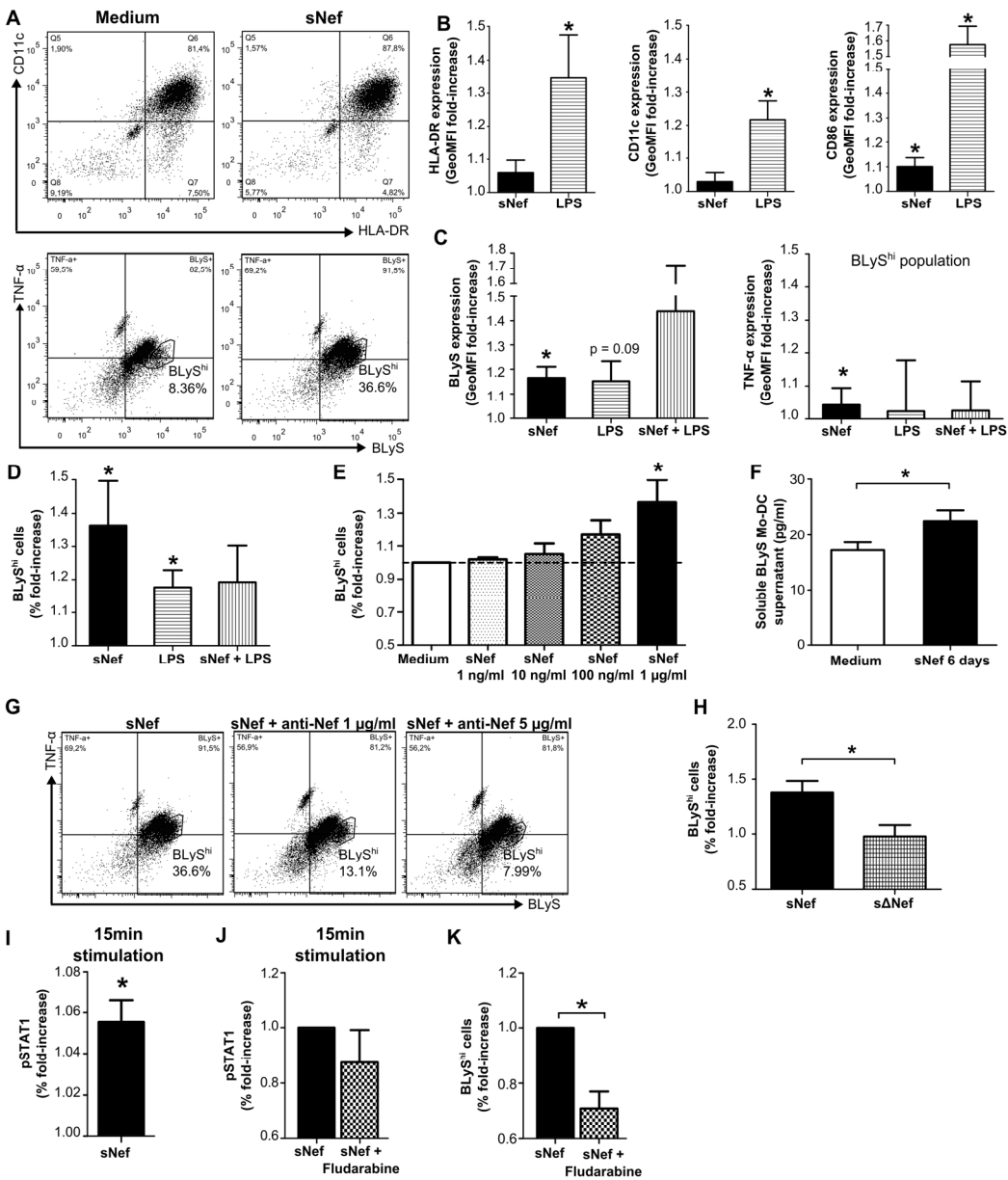


Figure 4

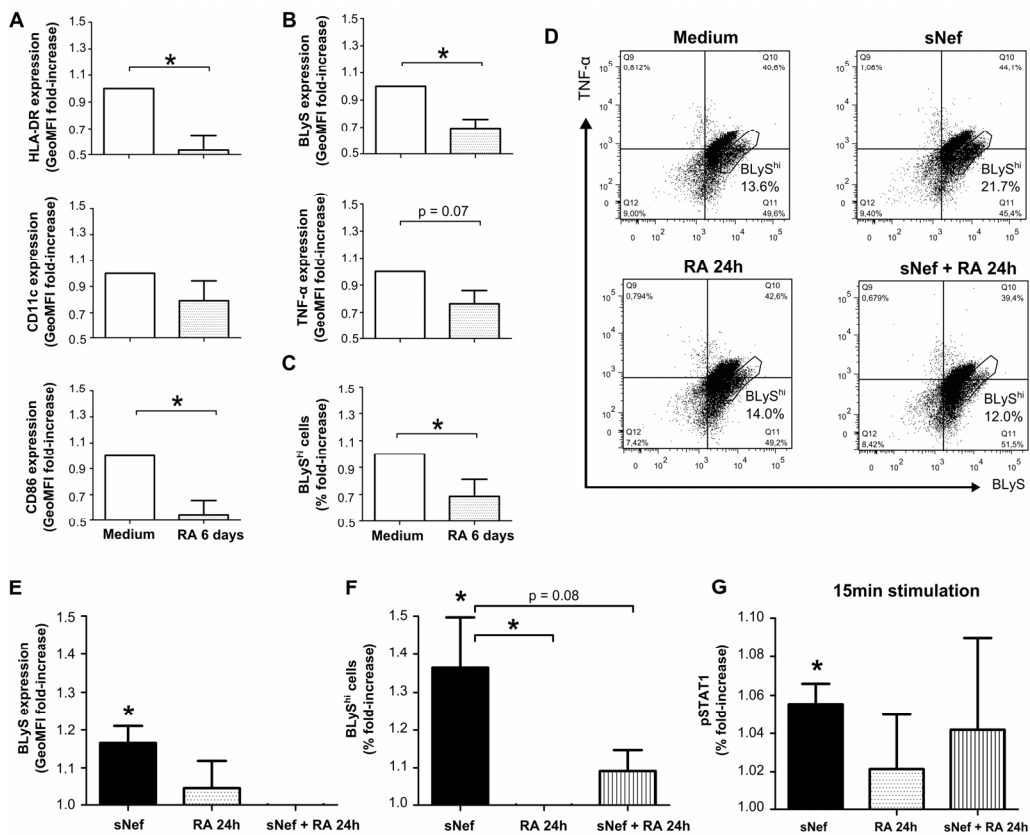


Figure 5

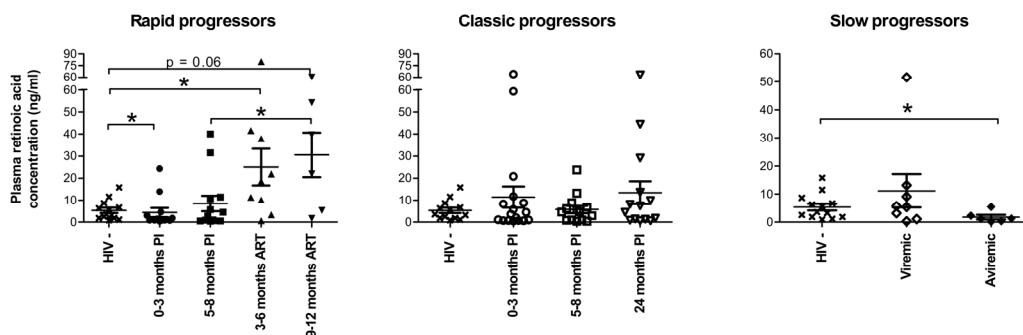


Figure 6

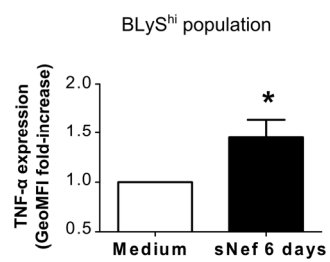


Figure supplémentaire 1

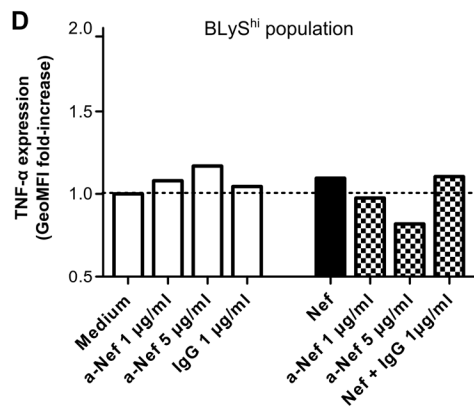
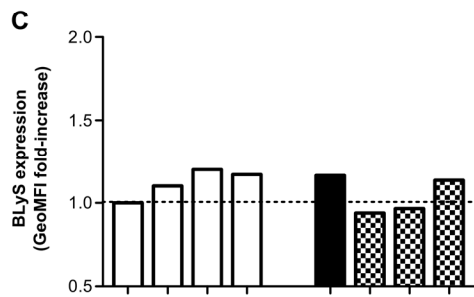
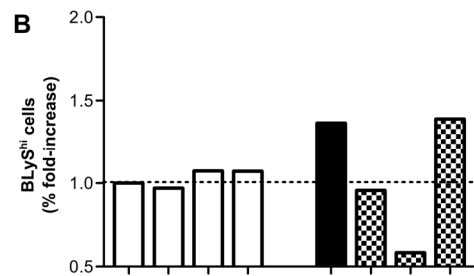
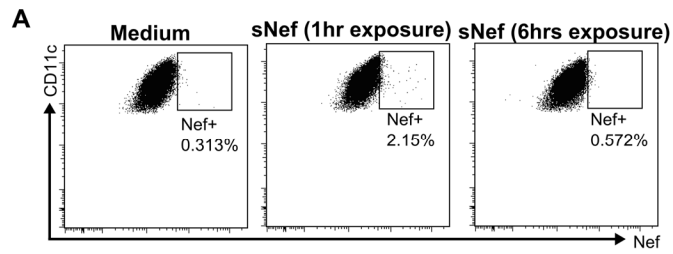


Figure supplémentaire 2

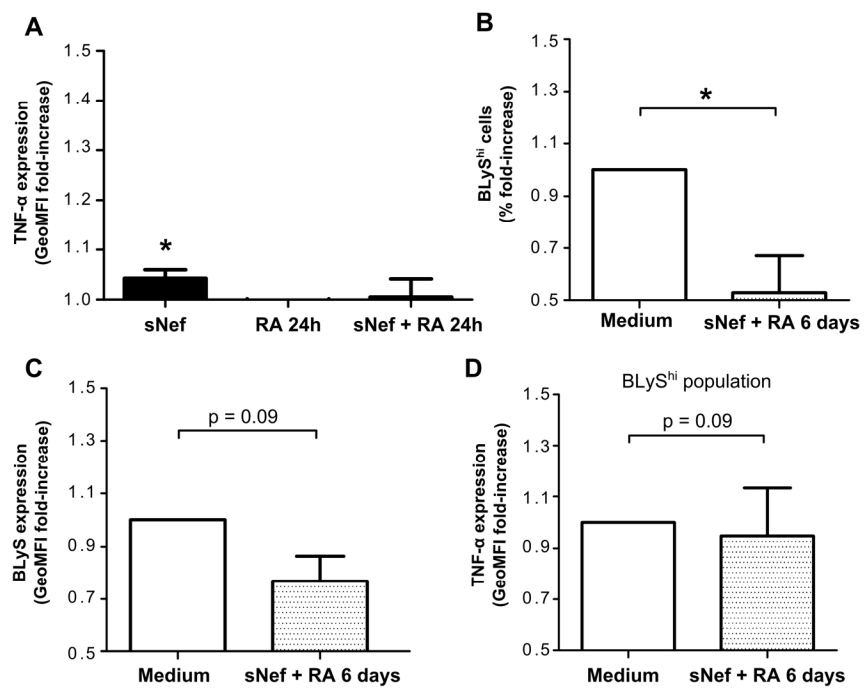


Figure supplémentaire 3

Annexe 3

Étude de la migration de populations de lymphocytes B du sang de patients VIH+ par la caractérisation de chimiokines et de leurs récepteurs

Affiche présentée lors de la Journée des étudiants du Réseau SIDA/Maladies infectieuses du Fond de Recherche du Québec – Santé (FRQS) le 31 octobre 2014

Étude de la migration de populations de lymphocytes B du sang de patients VIH⁺ par la caractérisation de chimiokines et de leurs récepteurs

Julie Gauvin, Josiane C.-Choquet, Julie Fontaine, Johanne Poudrier*, Michel Roger* et les cohortes PHI et LTNP du Réseau FRQS-SIDA
(*co-seniors) CRCHUM, Dép. Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal

Introduction

L'infection par le VIH cause une **dérégulation des populations du compartiment de lymphocytes B**. Ces populations se distinguent de part leurs différentes fonctions, niveaux de maturation et/ou d'activation.

Une étude longitudinale sur des spécimens sanguins de patients VIH⁺ des cohortes PHI et LTNP du Réseau FRQS-SIDA a démontré une dérégulation du compartiment des cellules B associée à un niveau élevé de B lymphocyte Stimulator (BlyS/BAFF) chez les **progressseurs classiques et rapides**, se manifestant par :

- une hyperglobulinémie
- une diminution des lymphocytes B totaux
- une altération des fréquences relatives des sous-populations B dont une augmentation de cellules de première ligne dites de la zone marginale (MZ) et une hyper-expression d'IL-10.

alors que les **contrôleurs élités** ne présentent pas de dérégulation du compartiment de lymphocytes B et ont un niveau normal de BlyS/BAFF. Chez les contrôleurs, seul la population MZ-like 'mature' est diminuée (Fontaine et al Blood 2011; C-Choquet et al 2014)

Hypothèse: La migration des populations B, dirigée par des gradients de chimiokines, est affectée suite à l'inflammation et la lymphopénie observées chez les progressseurs.

Objectif: Caractériser les chimiokines et récepteurs associés à la migration des populations de cellules B chez des patients VIH⁺ avec différents niveaux de progression de la maladie.

Sujets

Cohorte infection-primaire (FRQS-SIDA):

Progressseurs rapides (RP) :

cellules T CD4⁺ sanguin <250 cellules/mm³ 2 ans post-infection

Échantillons sanguins prélevés à :

- 0-3 mois post-infection
- 5-8 mois post-infection
- 3-6 mois post-trithérapie (ART)
- 9-12 mois post-ART

Progressseurs classiques (CP) :

compte cellules T CD4⁺ >500 cellules/mm³ pendant 2 ans.

Pas de ART

Échantillons sanguins prélevés à :

- 0-3 mois post-infection
- 5-8 mois post-infection
- 24 mois post-infection

Cohorte de progressseurs lents (LTNP):

Infectés depuis plus de 8 ans, cellules T CD4⁺ sanguin >500 cellules/mm³ pas de ART

progressseurs lents virémiques (contrôleurs élités CE)

Contrôles

donneurs sains, négatifs pour VIH, HBV et HCV, couplés par rapport à l'âge et au sexe.

Nous remercions les membres et coordonnateurs des cohortes; notamment Drs Cécile Tremblay, J-P Routy et Mario Legault

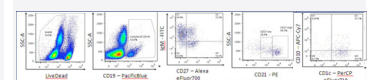
Méthodes

- Les chimiokines CXCL12, CXCL13, CCL20, CCL25 ainsi que CXCL11 ont été mesurées dans le plasma des patients par ELISA (R&D Systems) et Milliplex (Millipore)

- Analyse de PBMC (cryopréservés) ciblant les populations B suivantes:
 - Mémoire (CD19⁺CD27⁺lgM⁺CD21^{low}CD10⁺CD1c⁺)
 - Matures actives (CD19⁺CD27⁺lgM⁺CD21^{high}CD10⁺CD1c⁺)
 - Matures MZ-like (CD19⁺CD27⁺lgM⁺CD21^{low}CD10⁺CD1c⁺)
 - Précurseurs MZ-like (CD19⁺CD27⁺lgM⁺CD21^{low}CD10⁺CD1c⁺)
 - Transitionnelles immatures (CD19⁺CD27⁺lgM⁺CD21^{low}CD10⁺CD1c⁺)

par cytométrie en flux (FACSFortessa BD), (FlowJo 7.6.3).

Stratégie de délimitation pour l'identification des populations de cellules B

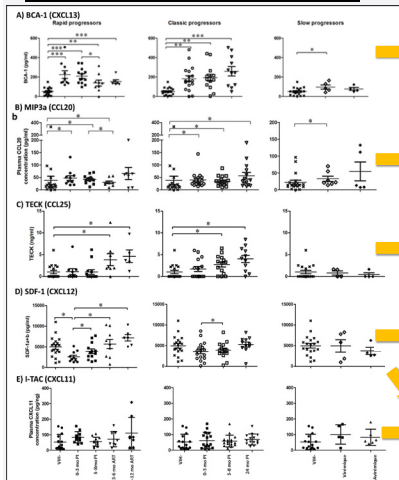


- L'expression des récepteurs CXCR4, CXCR5, CXCR7, CCR6 et CCR9 ont été analysés sur les différentes populations par cytométrie en flux.
- Toutes les statistiques ont été calculées avec GraphPad Prism 5

Résultats et Discussion

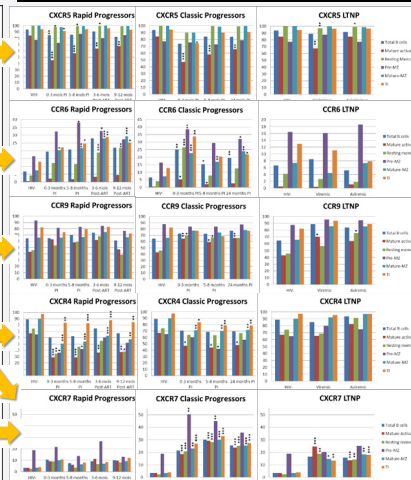
Chimiokines

Fig. 1 – Concentration des chimiokines dans le plasma



Récepteurs

Fig. 2 – Expression des récepteurs à chimiokines par les cellules B



Ces résultats suggèrent:

A) Niveaux élevés de CXCL13 (appel aux follicules des organes lymphoïdes → diminution du récepteur CXCR5 à la surface des cellules B, majoritairement cellules matures actives où l'on voit une diminution significative chez tous les individus infectés (RP, CP, LTNP virémiques)

Le mécanisme de CXCL13/CXCR5 cause l'internalisation du récepteur ce qui porte à croire que les cellules matures actives sont celles qui répondent le plus à l'appel de CXCR5. Tel qu'observé dans la littérature, CXCR5 est très présent sur toutes les populations de cellules B mais diminué chez les VIH (Nilsson et al Blood 2008)

B) Augmentation de CCL20 (appel en périphérie et aux muqueuses) chez les individus virémiques (RP,CP, LTNP virémiques). Le récepteur CCR6 tend à être augmenté pour toutes les populations B chez les progressseurs, particulièrement celles de la zone marginale et TI. Ceci suggère une possible boucle de régulation autocrine tel que démontré pour les Th17. (Ay et al Front Immunol 2013)

C) La chimiokine CCL25 (appel aux muqueuses intestinales) est augmentée seulement suite à ART ou en phase chronique de l'infection. L'expression de son récepteur CCR9 n'est pas vraiment modifiée par rapport aux contrôles VIH-négatifs sauf pour une augmentation sur la population mature activée chez les progressseurs classiques et LTNP virémiques. Ces observations suggèrent un mécanisme semblable à CCR6.

D-E) CXCR7 est un récepteur de CXCL11 et CXCL12 (appel à la moelle osseuse, aux organes lymphoïdes et en périphérie) . Son affinité pour CXCL12 est plus élevée que CXCR4 et il agit en tant que « scavenger » de CXCL12 pour réguler sa liaison à CXCR4 (Naumann et al PLOS One 2010)

Nous observons pour les RP que les niveaux de CXCL12 varient pendant le cours de l'infection et tendent à être bas en phase aiguë puis à augmenter. De façon similaire, CXCR4 est diminué pour toutes les populations B. Son expression est basse en début d'infection et augmente avec le temps et/ou ART sans toutefois atteindre le niveau des VIH-. L'expression de CXCR7 n'est toutefois pas modifiée chez les RP.

On observe cependant une augmentation de CXCR7 sur la majorité des populations B des CP et LTNP qui est concomitante avec les niveaux normaux de CXCL12, suggérant que la régulation via cette boucle n'est pas autant altérée que chez les RP

En Bref:

- La dérégulation du compartiment B est concomitante avec un appel de la plupart des populations vers la périphérie et ce de façon plus marquée chez les RP. Les populations actives et précurseurs (TI, MZ-Like) étant surtout recrutées via CCL20/CCR6.
- Nous remarquons que chez les LTNP, la migration des populations B est semblable à celle des contrôles VIH-. Toutefois, CXCR7 est le seul marqueur augmenté chez les avirémiques, ce qui renforce le besoin d'approfondir l'impact de l'expression de ce récepteur et des populations ciblées dans le contrôle de l'infection au VIH.
- Nous démontrons pour la première fois chez l'humain l'expression plus forte de CXCR7 par notre population d'intérêt « précurseur » MZ-like, ce qui est en accord avec le fait que, chez la souris, CXCR7 est un marqueur de rétention pour la zone marginale des organes lymphoïdes (Morse III et al Blood 2012)

Perspectives

La mise au point d'essais de chimiotactismes *in vitro* est en cours pour déterminer quelles populations B répondent le plus aux 5 chimiokines. Les populations B non-analysées feront l'objet d'études ultérieures.

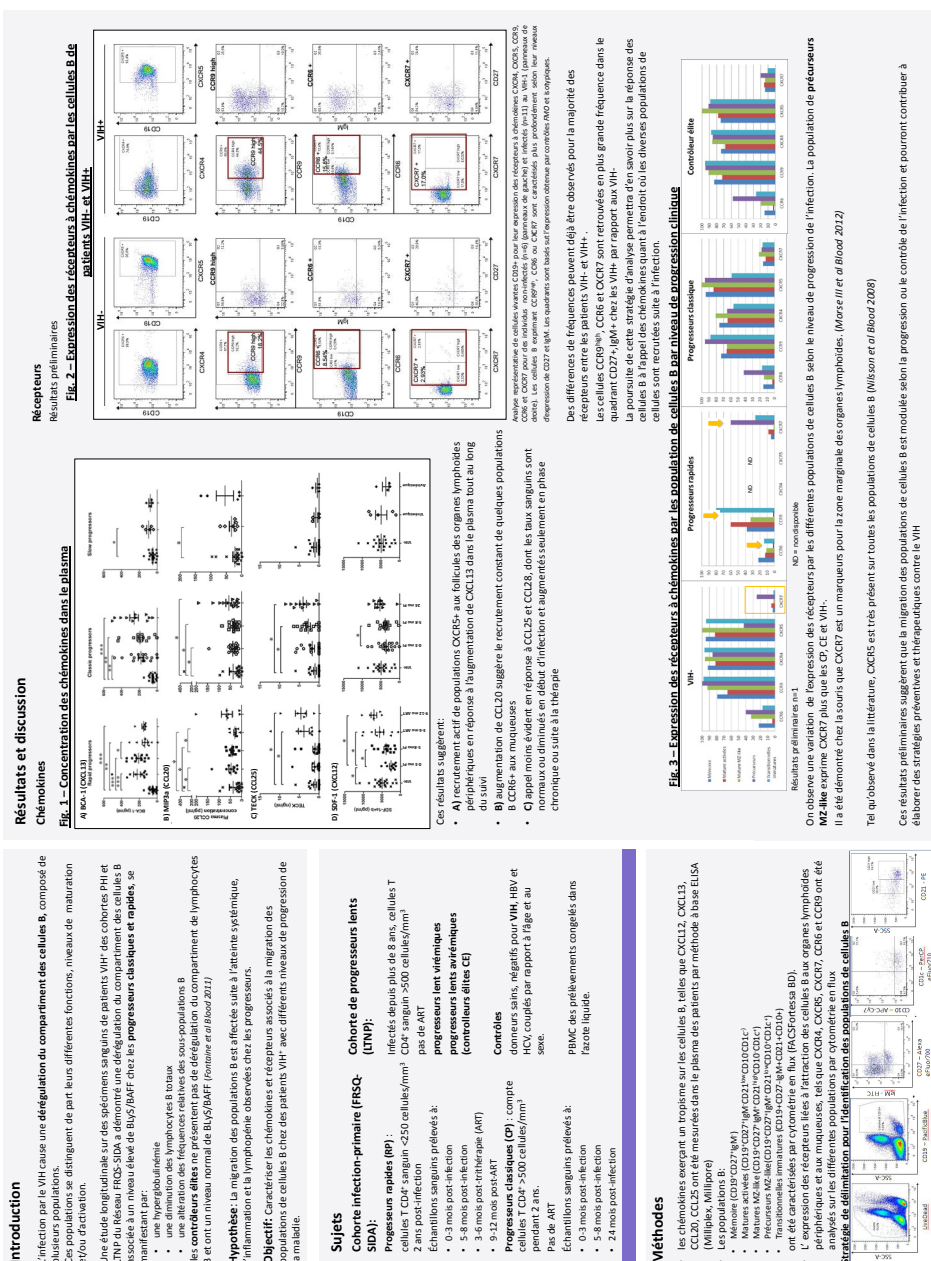
Annexe 4

Étude de l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs par les populations de lymphocytes B du sang de patients infectés par le VIH

Affiche présentée lors de la 3e Journée de la recherche du Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal le 3 mars 2014

Étude de l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs par les populations de lymphocytes B du sang de patients infectés par le VIH

Julie Gauvin, Josiane Chagnon-Choquet, Julie Fontaine, Johanne Poudrier* and Michel Roger*
(*co-seniors) CRCHUM, Dép. Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal



Annexe 5

Effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de BLYS/BAFF

Affiche présentée lors du 16^e Congrès des étudiants Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) le 5 décembre 2013

EFFET DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE SUR L'EXPRESSION DE BLYS/BAFF

Julie Gauvin^{*1}, Josiane Chagnon-Choquet¹, Johanne Poudrier² and Michel Roger²
(¹ co-premiers auteurs, ² co-séniors) CRCHUM, Dép. Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal

Introduction et contexte

La réponse des lymphocytes B s'avère primordiale dans la bataille contre le VIH. Ce compartiment de cellules est d'ailleurs dérégulé suite à l'infection.

Les cellules dendritiques (DCs), modulent la survie, la différenciation et l'activation des lymphocytes B via *B lymphocyte stimulator* (BlyS/BAFF)

Notre étude longitudinale des niveaux de BLYS dans le plasma et à la surface de DC myéloïdes (mDCs) de patients atteints du VIH avec différents degrés de progression,^{1,2} a démontré:

- une dérégulation des cellules B associée à un **niveau élevé de BLYS/BAFF** chez les progresseurs classiques (CP) et rapides (RP)
- les contrôleurs élités (EO) ne présentent **pas de dérégulation** du compartiment de lymphocytes B et ont un **niveau normal de BLYS/BAFF**

Les DCs sont parmi les premières à être exposées aux VIH dans les muqueuses et contribuent au maintien de l'équilibre entre la protection et la tolérance immunitaire.

Ce processus est influencé, entre autres, par les métabolites de la vitamine A dont l'acide rétinoïque (RA).

Hypothèse: RA peut avoir un impact sur le niveau d'expression de BLYS/BAFF par les DCs.

Objectif: Vérifier *in vitro* si RA influence le niveau d'expression de BLYS/BAFF par des DCs dérivées de monocytes (Mo-DCs)

Méthodes

Dérivation de Mo-DC:

Des monocytes CD14⁺ ont été isolés de cellules mononucléées de sang périphérique humain sain selon le protocole DynaBeads de Invitrogen. Les cellules ont ensuite été mises en culture pour une période totale de 6 jours. 100ng/ml d'IL-4 et 250 ng/ml de GM-CSF ont été ajoutés aux jours 0 et 3, avec ou sans ajout de RA à 1uM.

Au jour 6, 85-95% des Mo-DCs sont CD11c⁺ HLA-DR⁺ par cytométrie en flu.

La détection extra et intra-cellulaire de BLYS/BAFF a été effectuée suite à une incubation de 6 heures en présence de brefeldin A et le marquage fut accompli selon le protocole de BD Cytotfix/Cytoperm.

L'acquisition des données s'est faite par cytométrie en flu sur un appareil FACS Fortessa (BD) et l'analyse à l'aide des logiciels FlowJo et GraphPad Prism.

Résultats

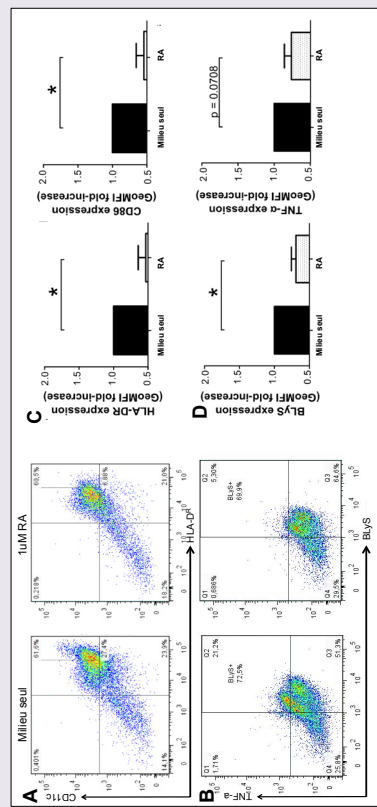


Fig. 1 Mo-DCs dérivés en présence de RA ont un profil anti-inflammatoire
A) Représentation de Mo-DCs CD11c⁺ HLA-DR⁺ non-exposés à RA (panneau de gauche) et dérivés dans 1uM de RA pendant 6 jours (panneau de droite).
B) Expression de BLYS/BAFF par les populations DCs CD11c⁺ sans RA (panneau de gauche) ou dérivées pendant 6 jours dans 1uM de RA (panneau de droite).
C) Expression de HLA-DR (panneau de gauche) et de CD86 (panneau de droite) par les Mo-DCs exposés ou non à 1uM de RA pendant 6 jours. n=6
D) Expression de BLYS/BAFF (panneau de gauche) et de TNF-α (panneau de droite) par Mo-DCs exposés ou non à 1uM de RA pendant 6 jours. n=6
Expression déterminée par la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (geoMFI) p < 0.05, Student's unpaired t-test

Discussion

- Les Mo-DCs dérivés avec RA présentent un **phénotype plutôt anti-inflammatoire** avec notamment une diminution significative des niveaux de HLA-DR et CD86.
- Nous démontrons pour la première fois que les niveaux d'expression de BLYS et TNF-α sont aussi diminués de façon significative en présence de RA.
- La production de BLYS/BAFF par les DCs est donc influencée par le métabolisme de la vitamine A en acide rétinoïque.

Perspectives

- Influence de la **dose** de RA sur inflammation
- Observer les niveaux de RA dans les muqueuses de patients contrôlant l'infection.

Références

- ¹ Johanne Poudrier, Josiane Chagnon-Choquet, and Michel Roger (2012), Influence of Dendritic Cells on B-Cell Responses during HIV Infection, *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 592187, 10 pages, doi:10.1155/2012/592187
- ² Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. (2011) High expression levels of B lymphocyte stimulator (BlyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B cell disease progression in humans. *Blood* 117: 146-155
- Moore S, Fauce A. S. (2013) Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunological Reviews*, 254: 207-224.